



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

INSTITUTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

Tese de doutorado

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE N-  
NITROSAMINAS EM AMOSTRAS DE XAMPU POR  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À DETECÇÃO POR  
ARRANJO DE DIODOS, ELETROQUÍMICA E ESPECTROMETRIA DE  
MASSAS

Larissa de Souza Canaes

Orientadora: Profa. Dra. Susanne Rath

**CAMPINAS**  
Fevereiro 2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE  
QUÍMICA DA UNICAMP**

C16d      Canaes, Larissa de Souza.  
Desenvolvimento de métodos para determinação de  
n-nitrosaminas em amostras de xampu por cromatografia  
líquida acoplada à detecção por arranjo de diodos,  
eletroquímica e espectrometria de massas / Larissa de  
Souza Canaes. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientadora: Profa. Dra. Susanne Rath.

Doutorado - Universidade Estadual de Campinas,  
Instituto de Química.

1. N-nitrosaminas. 2. Xampu. 3. Cromatografia  
líquida. 4. Espectrometria de massas. I. Rath, Susanne.  
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de  
Química. III. Título.

**Título em inglês:** Development of analytical methods for determination of n-nitrosamines in shampoo samples by liquid chromatography coupled to diode array, electrochemical and mass spectrometry detector

**Palavras-chaves em inglês:** N-nitrosamines, Shampoo, Liquid chromatography, Mass spectrometry

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:** Profa. Dra. Susanne Rath (orientadora), Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho (DQ-UFSCar), Profa. Dra. Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz (DQ-UFV), Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Ana Valéria Colnaghi Simionato Cantú (IQ-UNICAMP)

**Data de defesa:** 21/02/2011





**Dedico este trabalho aos meus pais,  
Milton e Elizabete e à minha irmã  
Taissa, por todo amor, incentivo,  
apoio, carinho e compreensão.**



## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Profa. Dra. Susanne Rath, pela oportunidade, orientação, apoio durante todos esses anos, carinho e amizade.

À Universidade Estadual de Campinas, em especial ao Instituto de Química, onde esse trabalho foi realizado, pelo suporte disponibilizado.

Aos Profs. Drs. José Alberto Fracassi da Silva, Carol Hollingworth Collins e Ana Valéria Colnaghi Simionato Cantú, pelas sugestões durante o exame de qualificação.

Às agências de fomento CNPq, pela bolsa de doutorado concedida, e Fapesp, pelo auxílio à pesquisa.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos, em especial ao Laboratório de Toxicologia coordenado pelo Prof. Dr. Felix Reyes, pela realização de alguns estudos contidos neste trabalho.

Aos meus colegas do laboratório Paracelsus: Lúcia, Isarita, Keity, Jonas, Ricardo, Cyntia, Fernando, Leonardo, Leandro, Letícia, Francisco, Natália.

Aos meus colegas do Instituto de Química: Rúbia, Rafael, Cristiane, Marcelo, Marcel, Aline, Márcio, Leonardo, pelos momentos de descontração.

Às minhas amigas Livia e Milena pela amizade, carinho, companheirismo e apoio de sempre.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho.





## **Curriculum Vitae**

### **Dados Pessoais**

Nome: Larissa de Souza Canaes

e-mail: lcanaes@yahoo.com.br

### **Formação Acadêmica/Titulação**

- |             |  |
|-------------|--|
| 2005 - 2011 | Doutorado em Química. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil.<br>Título: Desenvolvimento de métodos para determinação de N-nitrosaminas em amostras de xampu por cromatografia líquida acoplada à detecção por arranjo de diodos, eletroquímica e espectrometria de massas.<br>Orientador: Profa. Dra. Susanne Rath<br>Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |
| 2002 - 2004 | Mestrado em Química. Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, Brasil.<br>Título: Desenvolvimento de métodos para determinação de metilbrometo de homatropina em produtos farmacêuticos empregando turbidimetria em fluxo e titulação condutimétrica.<br>Orientador: Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho   |
| 1997 - 2003 | Licenciatura Plena em Química.<br>Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, Brasil   |
| 1997 - 2001 | Bacharelado em Química.<br>Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, Brasil  |

### **Artigos completos publicados em periódicos**

MARTINS, I., CARREIRA, F.C.; CANAES, Larissa S., CAMPOS JR, F.A.S.; CRUZ, Letícia M.S. RATH, Susanne Determination of parabens in shampoo using high performance liquid chromatography with amperometric detection on a boron-doped diamond electrode. Aceito para publicação na Talanta em 17/4/2011.

MARTINS, I., CANAES, Larissa S., DORETTO, K.M., RATH, Susanne Boron-doped diamond electrode coupled to liquid chromatography: Application to simultaneous determination of benzodiazepines. *Electroanalysis* (New York), v.22, p.455 - 462, 2010.

RATH, Susanne, CANAES, Larissa S. Contaminação de produtos de higiene e cosméticos por N-nitrosaminas. *Química Nova*, v.32, p.2159 - 2168, 2009.

CANAES, Larissa S., BRANCALION, M. L., ROSSI, A.V., RATH, Susanne Using candy samples to learn about sampling techniques and statistical data evaluation. *Journal of Chemical Education*. , v.85, p.1083 - 1088, 2008.

CANAES, Larissa S., FATIBELLO-FILHO, Orlando Determinação turbidimétrica de metilbrometo de homatropina em formulações farmacêuticas empregando um sistema de análise por injeção em fluxo. *Química Nova* (Impresso). , v.29, p.1237 - 1240, 2006.

CANAES, Larissa S., LEITE, Oldair D., FATIBELLO-FILHO, Orlando Flow-injection turbidimetric determination of homatropine methylbromide in pharmaceutical formulations using silicotungstic acid as precipitant reagent. *Talanta* (Oxford). , v.69, p.239 - 242, 2006.

SILVA, Claudineia R, VIEIRA, Heberth J, CANAES, Larissa S., NÓBREGA, Joaquim A, FATIBELLO FILHO, Orlando Flow injection spectrophotometric method for chloride determination in natural waters using Hg(SCN) immobilized in epoxy resin. *Talanta* (Oxford). , v.65, p.965 - 970, 2005.

ANICETO, Clezio, CANAES, Larissa S., FATIBELLO FILHO, Orlando Determinação espectrofotométrica de vitamina B2 (riboflavina) em formulações farmacêuticas empregando sistema de análises por injeção em fluxo. *Química Nova* (Impresso). , v.23, p.637 - 640, 2000.

## **Apresentação de trabalho em eventos científicos**

MARTINS, Isarita.; CANAES, Larissa S., DORETTO, Keity M.; RATH, Susanne "Boron-doped diamond electrode coupled to liquid chromatography: application to simultaneous determination of benzodiazepines in pharmaceuticals preparations" In: 7<sup>th</sup> International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP), 2009, Ribeirão Preto-SP.

MARTINS, Isarita.; CRUZ, Letícia M.S.; CANAES, Larissa S., CAMPOS JR, F.A.S.; RATH, Susanne. Determinação de parabenos em xampus por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica sob eletrodo de diamante dopado com boro. In: XVI Congresso Brasileiro de Toxicologia (CBTox), 2009, Belo Horizonte-MG.

CANAES, Larissa S., CAMPOS JR, F.A.S., CARREIRA, F.C., CODOGNOTO, Lucia; RATH, Susanne; Desenvolvimento de método para determinação dos conservantes Metil-Etil e propilparabeno em antitranspirantes por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica sobre eletrodo de diamante dopado com boro In: 12º Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas (COLACRO XII), 2008, Florianópolis-SC.

CANAES, Larissa S., MARTINS, I., RATH, Susanne. Determinação de benzodiazepínicos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica sobre eletrodo de diamante dopado com boro In: 12º Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas (COLACRO XII), 2008, Florianópolis-SC.

CANAES, Larissa S., CODOGNOTO, Lucia; REYES, F.G., RATH, Susanne Comportamento eletroquímico da nitrosodietanolamina no eletrodo de diamante dopado com boro In: 14º Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa-PB.

CANAES, Larissa S., RATH, Susanne. Construção de um detector eletroquímico wall-jet usando eletrodo de diamante para análise em fluxo e cromatografia líquida de alta eficiência In: 14º Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa-PB.

CANAES, Larissa S., CODOGNOTO, Lucia; AVACA, Luis Alberto; RATH, Susanne Construção e avaliação de uma célula eletroquímica usando eletrodo de diamante para a determinação amperométrica de nitrosaminas por HPLC In: XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2007, Águas de Lindóia-SP.

CODOGNOTO, Lucia; CANAES, Larissa S., AVACA, Luis Alberto; RATH, Susanne; Potencialidade eletroanalítica do eletrodo de diamante dopado com boro na determinação voltamétrica de nitrosaminas In: XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2007, Águas de Lindóia-SP.

CANAES, Larissa S., FATIBELLO FILHO, Orlando Sistema de análise em fluxo para determinação de metilbrometo de homatropina em formulações farmacêuticas In: 13º Encontro Nacional de Química Analítica, 2005, Niterói-RJ.

CANAES, Larissa S., ANICETO, Clezio, FATIBELLO FILHO, Orlando Determinação turbidimétrica em fluxo de metilbrometo de homatropina em produtos farmacêuticos In: 12º Encontro Nacional de Química Analítica, 2003, São Luís.-MA.

FATIBELLO FILHO, Orlando, ANICETO, Clezio, CANAES, Larissa S. Flow injection spectrophotometric determination of paracetamol (Acetaminophen) in pharmaceutical formulations In: 8th International Conference on Flow Analysis, 2000, Varsóvia, Polônia.

FATIBELLO FILHO, Orlando, ANICETO, Clezio, CANAES, Larissa S., Carla C. S. Cavaleiro Spectrophotometric determination of vitamin B2 (Riboflavin) in pharmaceutical formulations using flow injection analysis In: 8th International Conference on Flow Analysis, 2000, Varsóvia, Polônia.

ANICETO, Clezio, CANAES, Larissa S., FATIBELLO FILHO, Orlando Determinação espectrofotométrica por injeção em fluxo de vitamina B2 (Riboflavina) em formulações farmacêuticas In: 10º Encontro Nacional de Química Analítica, 1999, Santa Maria.

CANAES, Larissa S., FATIBELLO FILHO, Orlando, ANICETO, Clezio Determinação espectrofotométrica por injeção em fluxo de vitamina B2 (Riboflavina) em formulações farmacêuticas In: VII Congresso de Iniciação Científica, 1999, São Carlos.

## RESUMO

### **Desenvolvimento de métodos para determinação de N-nitrosaminas em amostras de xampu por cromatografia líquida acoplada à detecção por arranjo de diodos, eletroquímica e espectrometria de massas**

As N-nitrosaminas (NA) são compostos N-nitrosos, que mostraram ser carcinogênicas para uma grande variedade de animais experimentais. Além disso, elas apresentam atividade teratogênica e mutagênica. As NA foram encontradas, durante as últimas três décadas, em uma variedade de produtos de consumo, incluindo cosméticos e produtos de higiene e suas matérias-primas. As NA mais comumente encontradas em cosméticos são a N-nitrosodietanolamina (NDELA), N-nitrosomorfolina (NMOR) e N-nitrosodimetilamina (NDMA), em concentrações que variam desde  $\mu\text{g kg}^{-1}$  até  $\text{mg kg}^{-1}$ . Os objetivos deste trabalho foram a avaliação do comportamento eletroquímico de NA sobre eletrodo de diamante dopado com boro e construção de uma célula amperométrica para ser associada ao cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), assim como o desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de NA em xampu, usando a cromatografia líquida, associada ao detector eletroquímico desenvolvido, arranjo por fotodiodos e espectrometria de massas. O comportamento eletroquímico das NA foi estudado usando voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada; foram avaliados composição, concentração e pH do eletrólito suporte. A separação da NA foi realizada em uma coluna C18 XBridge<sup>TM</sup> e uma fase móvel composta de água/acetonitrila e eluição por gradiente. No preparo de amostras foram avaliadas a extração líquido-líquido, extração em fase sólida (C18 e sílica) e a dispersão da matriz em fase sólida. A performance dos diferentes sistemas de detecção associadas ao HPLC foram comparados na determinação de NA em xampu. Finalmente, o método de cromatografia líquida-espectrometria de massas foi validado para a determinação de NMOR e NDMA em xampu, mediante avaliação dos seguintes parâmetros: faixa linear, linearidade, precisão intra-dia e inter-dia, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão. O método foi aplicado na determinação de NA em amostras de xampu.



## ABSTRACT

### **Development of analytical methods for determination of N-nitrosamines in shampoo samples by liquid chromatography coupled to diode array, electrochemical and mass spectrometry detectors**

N-nitrosamines (NA) are N-nitroso compounds, showed to be carcinogenic in a wide variety of experimental animals. In addition, they also present mutagenic and teratogenic activities. N-nitrosamines have been found during the last three decades in a variety of consumer products, including cosmetic and personal care products, and their raw materials. The most common NA detected in cosmetics were N-nitrosodiethanolamine (NDELA), N-nitrosomorpholine (NMOR) and N-nitrosodimethylamine (NDMA), in concentrations varying from  $\mu\text{g kg}^{-1}$  to  $\text{mg kg}^{-1}$ . The aims of this work were the evaluation of the electrochemical behavior of NA on a boron doped diamond electrode and construction of an amperometric cell to be coupled to high performance liquid chromatography (HPLC), as well as the development and validation of methods for determination of NA in shampoo, using liquid chromatography coupled to the developed electrochemical cell, photodiode array and mass spectrometry detectors. The electrochemical behavior of NA was studied using cyclic voltammetry and square wave voltammetry; composition, concentration and pH of the electrolyte were evaluated. The separation of NA was achieved using a C18 XBridge<sup>TM</sup> column and mobile phase of water and acetonitrile under gradient elution. For sample preparation liquid-liquid extraction, solid phase extraction (C18 and silica) and matrix solid phase dispersion were evaluated. The performance of the different detectors coupled to liquid chromatography to the NA determination in shampoo was compared. Finally, a liquid-chromatography-mass spectrometry method was validated to the determination of NMOR and NDMA in shampoo, thorough the following parameters: linear range, linearity, intra-day and inter-day precision, selectivity, limit of detection, limit of quantification and accuracy. The method was applied to the determination of NA in shampoo samples.





# SUMÁRIO

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>Lista de abreviaturas</b>  | xxiii         |
| <b>Lista de tabelas</b>   | xxv           |
| <b>Lista de figuras</b>   | xxix          |
| <b>CAPÍTULO I</b>   | <b>1</b>      |
| <b>Revisão Bibliográfica</b>  |               |
| <b>I.1 - INTRODUÇÃO</b>   | <b>3</b>      |
| <b>I.2-PROPRIEDADES QUÍMICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DAS N-NITROSAMINAS</b>   | <b>4</b>      |
| <b>I.3 - ASPECTOS TOXICOLÓGICOS</b>   | <b>7</b>      |
| <b>I.4 - N-NITROSAMINAS EM PRODUTOS DE HIGIENE E COSMÉTICOS</b>   | <b>9</b>      |
| <b>I.5 - OCORRÊNCIA DE N-NITROSAMINAS EM PRODUTOS COSMÉTICOS</b>  | <b>16</b>     |
| <b>I.6 - ASPECTOS DE LEGISLAÇÃO</b>   | <b>18</b>     |
| <b>I.7 - MÉTODOS ANALÍTICOS</b>   | <b>24</b>     |
| I.7.1 - Métodos Cromatográficos   | <b>26</b>     |
| I.7.2 - Métodos Eletroquímicos  | <b>30</b>     |
| <b>I.8 - PREPARO DE AMOSTRAS</b>  | <b>33</b>     |
| <b>CAPÍTULO II</b>  | <b>37</b>     |
| <b>Objetivos</b>  |               |
| <b>CAPÍTULO III</b>   | <b>41</b>     |
| <b>Estudo do comportamento eletroquímico de N-nitrosaminas sob eletrodo de diamante dopado com boro e confecção de um detector amperométrico para acoplamento em um cromatógrafo líquido de alta eficiência</b> |               |
| <b>III.1 - INTRODUÇÃO</b>   | <b>43</b>     |
| <b>III.2 - OBJETIVOS</b>  | <b>43</b>     |
| <b>III.3 - MATERIAL E MÉTODOS</b>   | <b>44</b>     |
| III.3.1 - Padrões Analíticos  | <b>44</b>     |
| III.3.2 - Reagentes e Soluções  | <b>44</b>     |

|  |           |
|--|-----------|
| III.3.2.1 - Solução de N-nitrosaminas  | 44        |
| III.3.2.2 - Solução de fosfato de sódio (0,10 mol L <sup>-1</sup> )  | 44        |
| III.3.2.3 - Solução do par redox (K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]/K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ])                         | 45        |
| III.3.3 - Equipamentos   | 45        |
| III.3.3.1 - Eletrodo de diamante   | 46        |
| III.3.3.2 - Célula eletroquímica utilizada para o estudo do comportamento eletroquímico das N-nitrosaminas                             | 46        |
| III.3.3.3 - Célula eletroquímica confeccionada para detecção amperométrica associada ao sistema de cromatografia líquida               | 46        |
| III.3.4 - Procedimento Experimental  | 47        |
| III.3.4.1 - Condicionamento do eletrodo de diamante dopado com boro  | 47        |
| III.3.4.2 – Voltametria  | 48        |
| III.3.4.3 - Cromatografia líquida associada à detecção eletroquímica   | 49        |
| <b>III.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>  | <b>49</b> |
| III.4.1 - Estudo do comportamento eletroquímico de N-nitrosaminas sobre o eletrodo de diamante dopado com boro                         | 50        |
| III.4.1.1 - Voltametria cíclica  | 50        |
| III.4.1.1.1 - Influência do pH   | 51        |
| III.4.1.1.2 - Influência da velocidade de varredura  | 54        |
| III.4.1.2 - Voltametria de onda quadrada   | 56        |
| III.4.1.2.1 - Variação da frequência de onda quadrada  | 56        |
| III.4.1.2.2 - Variação da amplitude da onda quadrada   | 57        |
| III.4.1.2.3 - Variação do incremento de varredura  | 58        |
| III.4.1.3 - Dependência da corrente de pico em função da concentração  | 60        |
| III.4.2 – Confeção e avaliação do detector eletroquímico <i>wall-jet</i> utilizando como eletrodo de trabalho diamante dopado com boro | 62        |
| III.4.2.1 – Confeção e caracterização da célula eletroquímica  | 62        |
| III.4.2.2 - Avaliação da célula <i>wall-jet</i> associada ao HPLC  | 64        |

|   |               |
|---|---------------|
| III.4.2.2.1 – Curva analítica   | 65            |
| <b>III.5 - CONCLUSÕES</b>   | <b>67</b>     |
| <br><b>CAPÍTULO IV</b>  | <br><b>69</b> |
| <b>Determinação de N-nitrosaminas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a diversos tipos de detectores</b>          |               |
| <b>IV.1 - INTRODUÇÃO</b>  | <b>71</b>     |
| <b>IV.2 - OBJETIVOS</b>   | <b>72</b>     |
| <b>IV.3 - MATERIAL E MÉTODOS</b>  | <b>73</b>     |
| IV.3.1 - Padrões Analíticos   | 73            |
| IV.3.2 - Reagentes e Soluções   | 73            |
| IV.3.2.1 - Solução estoque de N-nitrosaminas  | 73            |
| IV.3.3 - Equipamentos   | 73            |
| IV.3.3.1 - Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector de arranjo de fotodiodos                                  | 73            |
| IV.3.3.2 - Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector eletroquímico (célula <i>wall-jet</i> )                   | 74            |
| IV.3.3.3 - Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector eletroquímico (célula <i>thin-layer</i> )                 | 74            |
| IV.3.3.4 - Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector de espectrometria de massas                               | 75            |
| IV.3.3.5 - Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector de espectrometria de massas em <i>tandem</i>              | 75            |
| IV.3.3.6 - Medidas de pH  | 75            |
| IV.3.3.7 - Colunas cromatográficas  | 76            |
| IV.3.3.8 - Preparo de amostra   | 76            |
| IV.3.4 - Procedimento Experimental  | 76            |
| IV.3.4.1 - Otimização das condições de separação das N-nitrosaminas por cromatografia líquida com detector de arranjo de fotodiodos | 76            |
| IV.3.4.1.1 - Preparo de amostras I  | 77            |

|   |           |
|---|-----------|
| IV.3.4.1.2- Preparo de amostras II  | 78        |
| V.3.4.1.3 - Curva analítica na matriz   | 78        |
| IV.3.4.2 - Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector eletroquímico (célula <i>wall-jet</i> e <i>thin-layer</i> ) | 78        |
| IV.3.4.4 - Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector de espectrometria de massas (LC-MS/MS QToF)                 | 79        |
| IV.3.4.4.1- Preparo de amostras   | 80        |
| IV.3.4.4.2 - Curva analítica na matriz  | 81        |
| IV.3.4.5 - Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector de espectrometria de massas (LC-MS)                         | 81        |
| IV.3.4.5.1 - Preparo de amostras  | 82        |
| IV.3.4.5.2 - Curva Analítica na matriz  | 82        |
| IV.3.4.5.3 – Validação do método LC-MS  | 82        |
| <b>IV.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>  | <b>84</b> |
| IV.4.1 - Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector de arranjo de fotodiodos (HPLC-DAD)                           | 85        |
| IV.4.1.1 - Separação das N-nitrosaminas por cromatografia líquida de alta eficiência  | 85        |
| IV.4.1.2 - Curva analítica  | 91        |
| IV.4.1.3 - Preparo de amostras  | 94        |
| IV.4.1.4 - Curva analítica na matriz  | 101       |
| IV.4.2 - Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector eletroquímico (HPLC-ED) – Célula <i>wall-jet</i>              | 104       |
| IV.4.2.1 - Curva analítica  | 105       |
| IV.4.2.1 - Curva analítica na matriz  | 107       |
| IV.4.3 - Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector eletroquímico (HPLC-ED) – Célula <i>thin-layer</i>            | 109       |
| IV.4.3.1 - Curva analítica  | 110       |
| IV.4.3.2 - Curva analítica na matriz  | 112       |

|   |            |
|---|------------|
| IV.4.4 - Desenvolvimento de método para determinação de N-nitrosaminas em amostras de xampu por cromatografia líquida associada a espectrometria de massas em <i>tandem</i> | 117        |
| IV.4.4.1 - Otimização dos parâmetros para LC-MS/MS QToF   | 117        |
| IV.4.4.2 - Curva analítica  | 122        |
| IV.4.4.3 - Preparo de amostras  | 125        |
| IV.4.4.4 Curva analítica na matriz  | 129        |
| IV.4.5 - Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector de espectrometria de massas (LC-MS)   | 133        |
| IV.4.5.1 - Curva analítica  | 134        |
| IV.4.5.2 - Validação do método LC-MS  | 139        |
| IV.4.5.3 - Análise de amostras  | 144        |
| IV.4.6 - Comparação entre os métodos  | 145        |
| <b>CAPÍTULO V</b>   | <b>147</b> |
| <b>Conclusões</b>   |            |
| <b>CAPÍTULO VI</b>  | <b>151</b> |
| <b>Referências Bibliográficas</b>   |            |



## LISTA DE ABREVIATURAS

|         |   |
|---------|---|
| ACN:    | Acetonitrila  |
| ANVISA  | Agência Nacional de Vigilância Sanitária                              |
| DAD     | Detector de Arranjo de Diodos   |
| DDB     | Diamante Dopado com Boro  |
| ED      | <i>Electrochemical Detector</i>                                       |
| ESI     | <i>Electrospray Ionization</i>  |
| FDA     | <i>Food and Drug Administration</i>                                   |
| HPLC    | <i>High Performance Liquid Chromatography</i>                         |
| INMETRO | Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial |
| IUPAC   | <i>Internacional Union of Pure and Applied Chemistry</i>              |
| LC      | <i>Liquid Chromatography</i>  |
| LMR     | Limite Máximo de Resíduos   |
| LOD     | Limite de Detecção  |
| LOQ     | Limite de Quantificação   |
| MeOH    | Metanol   |
| MS      | <i>Mass Spectrometry</i>  |
| NA      | N-nitrosaminas  |
| NDEA    | N-nitrosodietilamina  |
| NDELA   | N-nitrosodietanolamina  |
| NDMA    | N-nitrosodimetilamina   |
| NMOR    | N-nitrosomorfolina  |
| Pt      | Platina   |
| Q       | Quadruplo   |
| ToF     | <i>Time of Flight</i>   |
| WHO     | World Health Organization   |





## LISTA DE TABELAS

|  | Página    |
|--|-----------|
| <b>CAPÍTULO I</b>  | <b>1</b>  |
| <b>Revisão Bibliográfica</b>   |           |
| <b>Tabela I.1</b> – Estruturas químicas das N-nitrosaminas encontradas em produtos cosméticos.   | <b>5</b>  |
| <b>Tabela I.2</b> – Exemplos de categorias de produtos comercializados em diferentes países.   | <b>20</b> |
| <b>Tabela I.3</b> - Especificação para presença de aminas em matéria-prima de produtos cosméticos.   | <b>23</b> |
| <b>Tabela I.4</b> – Trabalhos publicados sobre a determinação de N-nitrosaminas em produtos cosméticos e matérias-primas.  | <b>28</b> |
| <b>CAPÍTULO III</b>  | <b>41</b> |
| <b>Estudo do comportamento eletroquímico de N-nitrosaminas sob eletrodo de diamante dopado com boro e confecção de um detector amperométrico para acoplamento em um cromatógrafo líquido de alta eficiência</b>                                  |           |
| <b>Tabela III.1</b> – Equação da reta e coeficiente de regressão linear obtido para o intervalo de frequência de até 100 s <sup>-1</sup> .   | <b>57</b> |
| <b>Tabela III.2</b> – Parâmetros obtidos das curvas analíticas para as N-nitrosaminas utilizando voltametria de onda quadrada.   | <b>61</b> |
| <b>Tabela III.3</b> – Parâmetros obtidos dos voltamogramas cíclicos característicos para o par redox (K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]/K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]), utilizando a célula <i>wall-jet</i> e a célula convencional. | <b>64</b> |
| <b>Tabela III.4</b> – Parâmetros obtidos das curvas analíticas para as N-nitrosaminas utilizando HPLC-ED (célula <i>wall-jet</i> ).  | <b>67</b> |
| <b>CAPÍTULO IV</b>   | <b>69</b> |
| <b>Determinação de N-nitrosaminas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a diversos tipos de detectores</b>   |           |
| <b>Tabela IV.1</b> – Gradiente de eluição (Detecção DAD).  | <b>77</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>Tabela IV.2</b> – Gradiente de eluição (Detecção LC-MS/MS-QToF).   | <b>80</b>  |
| <b>Tabela IV.3</b> – Gradiente de eluição (Detecção LC-MS).   | <b>81</b>  |
| <b>Tabela IV.4</b> - Parâmetros cromatográficos obtidos para as Colunas C18 XTerra™ e C18 XBridge™.   | <b>91</b>  |
| <b>Tabela IV.5</b> – Parâmetros obtidos das curvas analíticas para as N-nitrosaminas utilizando HPLC-DAD.   | <b>93</b>  |
| <b>Tabela IV.6</b> – Teste de recuperação avaliando diferentes solventes na eluição da NDELA, NDMA e NMOR (5,0 µg mL <sup>-1</sup> ) no cartucho florisil, recheado com sílica após sorção da mistura de N-nitrosaminas.                              | <b>96</b>  |
| <b>Tabela IV.7</b> – Eficiência de extração (% de recuperação) para amostra de xampu fortificada com 12 µg g <sup>-1</sup> de NDELA, NDMA e NMOR. Cartucho Varian Bond Elut C <sub>18</sub> Eluição com H <sub>2</sub> O.                             | <b>98</b>  |
| <b>Tabela IV.8</b> – Eficiência de extração (% de recuperação) para amostra de xampu fortificada com 12 µg g <sup>-1</sup> de NDELA, NDMA e NMOR. Cartucho Varian Bond Elut C <sub>18</sub> Eluição com H <sub>2</sub> O com 1% de ácido fórmico v/v. | <b>99</b>  |
| <b>Tabela IV.9</b> – Eficiência de extração (% de recuperação) para amostra de xampu fortificada com 12 µg g <sup>-1</sup> de NDELA, NDMA e NMOR. Cartucho Varian Bond Elut C <sub>18</sub> Eluição com H <sub>2</sub> O:ACN 95:5 v/v.                | <b>99</b>  |
| <b>Tabela IV.10</b> – Teste de recuperação para amostra de xampu fortificada com 12 µg g <sup>-1</sup> de NDELA, NDMA e NMOR no cartucho HLB-OASIS e eluido com H <sub>2</sub> O:ACN 95:5 v/v.  | <b>100</b> |
| <b>Tabela IV.11</b> – Teste de recuperação para amostra de xampu fortificada com 12 µg g <sup>-1</sup> de NDELA, NDMA e NMOR no cartucho Analítica C <sub>18</sub> e eluido com H <sub>2</sub> O:ACN 95:5 v/v.  | <b>100</b> |
| <b>Tabela IV.12</b> – Parâmetros obtidos das curvas analíticas na matriz para as N-nitrosaminas utilizando HPLC-DAD.  | <b>104</b> |
| <b>Tabela IV.13.</b> – Parâmetros obtidos das curvas analíticas para as N-nitrosaminas utilizando HPLC-ED (célula <i>wall-jet</i> ).  | <b>107</b> |
| <b>Tabela IV.14</b> – Parâmetros obtidos das curvas analíticas na matriz, para as N-nitrosaminas, utilizando HPLC-ED célula ( <i>wall-jet</i> ).  | <b>109</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>Tabela IV.15</b> – Parâmetros obtidos das curvas analíticas para as N-nitrosaminas utilizando HPLC-ED célula <i>thin-layer</i> ).                   | <b>112</b> |
| <b>Tabela IV.16</b> – Resultados qualitativos da presença de N-nitrosaminas nas amostras de xampu.   | <b>116</b> |
| <b>Tabela IV.17</b> - Íons de quantificação e de identificação das NA e os respectivos erros de exatidão entre as razões m/z teóricas e experimentais. | <b>118</b> |
| <b>Tabela IV.18</b> – Parâmetros obtidos das curvas analíticas para as NA utilizando LC-MS/MS QToF.  | <b>124</b> |
| <b>Tabela IV.19</b> – Parâmetros obtidos das curvas analíticas na matriz, para as NA, utilizando LC-MS/MS QToF.  | <b>132</b> |
| <b>Tabela IV.20</b> – Parâmetros obtidos das curvas analíticas para as NA utilizando LC-MS.  | <b>137</b> |
| <b>Tabela IV.21</b> – Parâmetros obtidos das curvas analíticas na matriz para as NA utilizando LC-MS.  | <b>139</b> |
| <b>Tabela IV.22</b> – Parâmetros obtidos da validação do método para determinação de NA utilizando LC-MS.  | <b>143</b> |
| <b>Tabela IV.23</b> – Resultados da presença de NA nas amostras de xampu.  | <b>144</b> |
| <b>Tabela IV.24</b> – Limite de detecção do instrumento, encontrado para os quatro sistemas de detecção utilizados. N-nitrosaminas no solvente.        | <b>146</b> |
| <b>Tabela IV.25</b> – Limite de quantificação, encontrado para os quatro sistemas de detecção utilizados. Nitrosaminas adicionadas à matriz de xampu.  | <b>146</b> |



## LISTA DE FIGURAS

|   | Página    |
|---|-----------|
| <b>CAPÍTULO I</b>   | <b>1</b>  |
| <b>Revisão Bibliográfica</b>  |           |
| <b>Figura I.1</b> - Biotransformação das N-nitrosaminas.  | <b>7</b>  |
| <b>Figura I.2</b> – Reações de formação de N-nitrosaminas catalisadas por formaldeído.  | <b>15</b> |
| <b>Figura I.3</b> – Principais procedimentos de preparo de amostras de cosméticos   | <b>35</b> |
| <b>CAPÍTULO III</b>   | <b>41</b> |
| <b>Estudo do comportamento eletroquímico de N-nitrosaminas sob eletrodo de diamante dopado com boro e confecção de um detector amperométrico para acoplamento em um cromatógrafo líquido de alta eficiência</b>   |           |
| <b>Figura III.1</b> - Célula eletroquímica construída para detecção amperométrica, associada ao sistema de cromatografia líquida.   | <b>47</b> |
| <b>Figura III.2</b> – Voltamogramas cíclicos obtidos para a NDELA, NMOR, NDMA e NDEA nas concentrações de $3,0 \cdot 10^{-4}$ ; $3,4 \cdot 10^{-4}$ ; $5,4 \cdot 10^{-4}$ e $3,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente, sobre o eletrodo de DDB.                      | <b>51</b> |
| <b>Figura III.3</b> - Voltamogramas cíclicos da NDELA, NMOR, NDMA e NDEA obtidos para o estudo do pH em $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com eletrodo de diamante dopado com boro.   | <b>52</b> |
| <b>Figura III.4</b> - Variação do potencial de pico com o pH do meio para NDELA, NMOR, NDMA e NDEA, nas concentrações de $3,0 \cdot 10^{-4}$ ; $3,4 \cdot 10^{-4}$ ; $5,4 \cdot 10^{-4}$ e $3,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente.                                | <b>53</b> |
| <b>Figura III.5</b> - Variação da corrente de pico com o pH do meio para NDELA, NMOR, NDMA e NDEA, nas concentrações de $3,0 \cdot 10^{-4}$ ; $3,4 \cdot 10^{-4}$ ; $5,4 \cdot 10^{-4}$ e $3,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente.                                 | <b>54</b> |
| <b>Figura III.6</b> - Variação da corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura para NMOR, NDELA, NDMA e NDEA, nas concentrações de $0,86 \cdot 10^{-4}$ ; $0,75 \cdot 10^{-4}$ ; $1,36 \cdot 10^{-4}$ e $0,95 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente. | <b>55</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura III.7</b> - Variação da amplitude da onda quadrada sobre as correntes de pico para NMOR, NDELA, NDMA e NDEA, nas concentrações de $0,86 \cdot 10^{-4}$ ; $0,75 \cdot 10^{-4}$ ; $1,36 \cdot 10^{-4}$ e $0,95 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente.   | <b>58</b> |
| <b>Figura III.8</b> - Variação do incremento de varredura sobre as correntes de pico de onda quadrada para NMOR, NDELA, NDMA e NDEA, nas concentrações de $0,86 \cdot 10^{-4}$ ; $0,75 \cdot 10^{-4}$ ; $1,36 \cdot 10^{-4}$ e $0,95 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente.   | <b>59</b> |
| <b>Figura III.9</b> – Curvas analíticas obtidas para NMOR, NDELA, NDMA e NDEA por SWV usando eletrodo DDB.  | <b>60</b> |
| <b>Figura III.10</b> - Voltamogramas cíclicos característicos para o par redox ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) na concentração de $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de $\text{H}_2\text{SO}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , utilizando a célula <i>wall-jet</i> construída. | <b>63</b> |
| <b>Figura III.11</b> – Cromatograma característico obtido para NDELA, NDMA e NMOR na concentração de $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , utilizando a célula <i>wall-jet</i> .  | <b>65</b> |
| <b>Figura III.12</b> - Curva analítica para N-nitrosodietanolamina no intervalo de 0,2 a $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando detecção eletroquímica.   | <b>66</b> |
| <b>Figura III.13</b> - Curva analítica para N-nitrosodimetilamina no intervalo de 0,5 a $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando detecção eletroquímica.  | <b>66</b> |
| <b>Figura III.14</b> - Curva analítica para N-nitrosomorfolina no intervalo de 0,2 a $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando detecção eletroquímica.   | <b>66</b> |

## **CAPÍTULO IV** **69**

### **Determinação de N-nitrosaminas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a diversos tipos de detectores**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura IV.1</b> .– Cromatograma para mistura de NDELA, NDMA, NMOR e NDEA na concentração de $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna C18 XTerra <sup>TM</sup> . Fase móvel água. Detector: DAD, $\lambda = 240 \text{ nm}$ .  | <b>86</b> |
| <b>Figura IV.2</b> – Cromatograma para mistura de NDELA, NDMA, NMOR e NDEA na concentração de $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ Coluna C18 XTerra <sup>TM</sup> . Fase móvel ACN:H <sub>2</sub> O com eluição por gradiente. Detector: DAD, $\lambda = 240 \text{ nm}$ . | <b>87</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura IV.3</b> – Cromatograma para mistura de NDELA, NDMA, NMOR e NDEA na concentração de 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna C8 XTerra <sup>TM</sup> . Fase móvel água. Detector: DAD, $\lambda = 240 \text{ nm}$ .   | <b>88</b> |
| <b>Figura IV.4</b> – Cromatograma para mistura de NDELA, NDMA, NMOR e NDEA na concentração de 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna ciano. Fase móvel água. Detector: DAD, $\lambda = 240 \text{ nm}$ .  | <b>89</b> |
| <b>Figura IV.5</b> – Cromatograma para mistura de NDELA, NDMA, NMOR e NDEA na concentração de 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna C18 XBridge <sup>TM</sup> . Fase móvel: água. Detector: DAD, $\lambda = 240 \text{ nm}$ .  | <b>90</b> |
| <b>Figura IV.6</b> – Cromatograma para mistura de NDELA, NDMA, NMOR e NDEA na concentração de 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna C18 XBridge <sup>TM</sup> . Fase móvel: ACN:H <sub>2</sub> O. Eluição por gradiente. Detector: DAD, $\lambda = 240 \text{ nm}$ .   | <b>90</b> |
| <b>Figura IV.7</b> – Cromatograma para mistura de NDELA, NDMA, NMOR e NDEA na concentração de 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna C18 XBridge <sup>TM</sup> . Fase móvel, ACN:H <sub>2</sub> O. Eluição por gradiente. Detector: DAD, $\lambda = 240 \text{ nm}$ .   | <b>92</b> |
| <b>Figura IV.8</b> - Curva analítica para N-nitrosodietanolamina no intervalo de 0,070 a 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Coluna C18 XBridge <sup>TM</sup> . Fase móvel, ACN:H <sub>2</sub> O. Eluição por gradiente. Detector: DAD, $\lambda = 240 \text{ nm}$ .  | <b>92</b> |
| <b>Figura IV.9</b> - Curva analítica para N-nitrosodimetilamina no intervalo de 0,070 a 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Coluna C18 XBridge <sup>TM</sup> . Fase móvel, ACN:H <sub>2</sub> O. Eluição por gradiente. Detector: DAD, $\lambda = 240 \text{ nm}$ .   | <b>93</b> |
| <b>Figura IV.10</b> - Curva analítica para N-nitrosomorfolina no intervalo de 0,070 a 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Coluna C18 XBridge <sup>TM</sup> . Fase móvel, ACN:H <sub>2</sub> O. Eluição por gradiente. Detector: DAD, $\lambda = 240 \text{ nm}$ .   | <b>93</b> |
| <b>Figura IV.11</b> - Cromatograma obtido para amostra de xampu fortificada com NDELA, NDMA e NMOR num nível de 2,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ , sorvida em sílica, empacotado em cartucho florisil e eluida com 5 mL DCM:acetona 40:60 v/v. Coluna C18 XBridge <sup>TM</sup> . Fase móvel:ACN:H <sub>2</sub> O. Eluição por gradiente. Detector: DAD, $\lambda = 240 \text{ nm}$ . | <b>97</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>Figura IV.12</b> - Cromatograma obtido para amostra de xampu (branco), percolado em cartucho C18 e eluido com 5 mL de H <sub>2</sub> O:ACN 95:5 v/v. Coluna C18 XBridge™. Fase móvel ACN:H <sub>2</sub> O. Eluição por gradiente. Detector: DAD, $\lambda$ = 240 nm.   | <b>101</b> |
| <b>Figura IV.13</b> - Cromatograma obtido para amostra de xampu fortificada com NDELA, NDMA e NMOR num nível de 10,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ , percolado em cartucho C18 e eluido com 5 mL de H <sub>2</sub> O/ACN 95:5 v/v. Coluna C18 XBridge™. Fase móvel:ACN:H <sub>2</sub> O. Eluição por gradiente. Detector: DAD, $\lambda$ = 240 nm. | <b>102</b> |
| <b>Figura IV.14</b> - Curva na matriz para N-nitrosodietanolamina no intervalo de fortificação de 1 a 15 $\mu\text{g g}^{-1}$ Coluna C18 XBridge™. Fase móvel, ACN:H <sub>2</sub> O. Eluição por gradiente. Detector: DAD, $\lambda$ = 240 nm.  | <b>102</b> |
| <b>Figura IV.15</b> - Curva na matriz para N-nitrosodimetilamina no intervalo de fortificação de 1 a 15 $\mu\text{g g}^{-1}$ Coluna C18 XBridge™. Fase móvel, ACN:H <sub>2</sub> O. Eluição por gradiente. Detector: DAD, $\lambda$ = 240 nm.   | <b>103</b> |
| <b>Figura IV.16</b> - Curva na matriz para N-nitrosomorfolina no intervalo de fortificação de 1 a 15 $\mu\text{g g}^{-1}$ Coluna C18 XBridge™. Fase móvel, ACN:H <sub>2</sub> O. Eluição por gradiente. Detector: DAD, $\lambda$ = 240 nm.  | <b>103</b> |
| <b>Figura IV.17</b> – Cromatograma obtido para NDELA (tr = 4,79), NDMA (tr = 6,34) e NMOR (tr = 10,66) na concentração de 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , utilizando a célula <i>wall-jet</i> . Coluna C18 XBridge™.  | <b>105</b> |
| <b>Figura IV.18</b> - Curva analítica para N-nitrosodietanolamina no intervalo de 0,2 a 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando detecção eletroquímica (célula <i>wall-jet</i> ).  | <b>106</b> |
| <b>Figura IV.19</b> - Curva analítica para N-nitrosodimetilamina no intervalo de 0,5 a 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando detecção eletroquímica (célula <i>wall-jet</i> ).   | <b>106</b> |
| <b>Figura IV.20</b> - Curva analítica para N-nitrosomorfolina no intervalo de 0,2 a 3,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando detecção eletroquímica (célula <i>wall-jet</i> ).  | <b>106</b> |
| <b>Figura IV.21</b> – Cromatograma obtido para amostra branco e amostra fortificada com 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ de NDELA, NDMA e NMOR, utilizando a célula <i>wall-jet</i> . Coluna C18 XBridge™.   | <b>108</b> |



|  |            |
|--|------------|
| <b>Figura IV.22</b> - Cromatograma obtido para NDELA ( $t_r = 4,67$ ), NDMA ( $t_r = 6,16$ ) e NMOR ( $t_r = 10,08$ ) na concentração de $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , utilizando detecção eletroquímica (célula <i>thin-layer</i> ) Coluna C18 XBridge™. Fase móvel fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0. Potencial: 2,0 V vs aço. | <b>110</b> |
| <b>Figura IV.23</b> - Curva analítica para N-nitrosodietanolamina no intervalo de 0,2 a $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando detecção eletroquímica (célula <i>thin-layer</i> ). Fase móvel fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0. Potencial: 2,0 V vs aço.  | <b>111</b> |
| <b>Figura IV.24</b> - Curva analítica para N-nitrosodimetilamina no intervalo de 0,2 a $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando detecção eletroquímica (célula <i>thin-layer</i> ). Fase móvel fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0. Potencial: 2,0 V vs aço.   | <b>111</b> |
| <b>Figura IV.25</b> - Curva analítica para N-nitrosomorfolina no intervalo de 0,2 a $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando detecção eletroquímica (célula <i>thin-layer</i> ). Fase móvel fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0. Potencial: 2,0 V vs aço.  | <b>112</b> |
| <b>Figura IV.26</b> - Cromatogramas obtidos para amostras de xampu 1 a 6, utilizando detecção eletroquímica (célula <i>thin-layer</i> ). Coluna C18 XBridge™. Fase móvel fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0. Potencial: 2,0 V vs aço.   | <b>114</b> |
| <b>Figura IV.27</b> - Cromatogramas obtidos para amostras de xampu 7 a 12, utilizando detecção eletroquímica (célula <i>thin-layer</i> ). Coluna C18 XBridge™. Fase móvel fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0. Potencial: 2,0 V vs aço.  | <b>115</b> |
| <b>Figura IV.28</b> - Espectro de massas para NDELA e NDMA, voltagem do capilar: 3500 V; voltagem do cone da amostra: 20 V; voltagem do cone de extração: 3 V; temperatura de dessolvatação 350 °C; temperatura da fonte de ionização: 120 °C; energia de ionização 2 V e energia de colisão 5 V.  | <b>119</b> |
| <b>Figura IV.29</b> - Espectro de massas para NMOR e NDEA, voltagem do capilar: 3500 V; voltagem do cone da amostra: 20 V; voltagem do cone de extração: 3 V; temperatura de dessolvatação 350 °C; temperatura da fonte de ionização: 120 °C; energia de ionização 2 V e energia de colisão 5 V.   | <b>120</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>Figura IV.30</b> – Cromatograma obtido para NDELA (aduto), na concentração de 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna: C18 XTerra <sup>TM</sup> . Fase móvel H <sub>2</sub> O:ACN com eluição gradiente numa vazão de 0,25 mL min <sup>-1</sup> .  | <b>122</b> |
| <b>Figura IV.31</b> – Cromatograma obtido para NDMA na concentração de 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna: C18 XTerra <sup>TM</sup> . Fase móvel H <sub>2</sub> O:ACN com eluição gradiente numa vazão de 0,25 mL min <sup>-1</sup> .  | <b>123</b> |
| <b>Figura IV.32</b> – Cromatograma obtido para NMOR, na concentração de 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna: C18 XTerra <sup>TM</sup> . Fase móvel H <sub>2</sub> O/ACN com eluição gradiente numa vazão de 0,25 mL min <sup>-1</sup> .   | <b>123</b> |
| <b>Figura IV.33</b> – Curva analítica obtida para o aduto da NDELA, no intervalo de concentração de 0,5 a 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna: C18 XTerra <sup>TM</sup> . Fase móvel H <sub>2</sub> O/ACN com eluição gradiente numa vazão de 0,25 mL min <sup>-1</sup> .                           | <b>123</b> |
| <b>Figura IV.34</b> – Curva analítica obtida para a NDMA, no intervalo de concentração de 0,5 a 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna: C18 XTerra <sup>TM</sup> . Fase móvel H <sub>2</sub> O/ACN com eluição gradiente numa vazão de 0,25 mL min <sup>-1</sup> .                                     | <b>124</b> |
| <b>Figura IV.35</b> – Curva analítica obtida para a NMOR, no intervalo de concentração de 0,5 a 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna: C18 XTerra <sup>TM</sup> . Fase móvel H <sub>2</sub> O/ACN com eluição gradiente numa vazão de 0,25 mL min <sup>-1</sup> .                                     | <b>124</b> |
| <b>Figura IV.36</b> – Cromatogramas com detecção por espectrometria de massas das amostras de xampus de 1 a 5.   | <b>126</b> |
| <b>Figura IV.37</b> – Cromatogramas com detecção por espectrometria de massas das amostras de xampus de 6 a 10.  | <b>127</b> |
| <b>Figura IV.38</b> – Cromatogramas com detecção por espectrometria de massas das amostras de xampus de 11, 12, 13 e 14.   | <b>128</b> |
| <b>Figura IV.39</b> – Cromatograma, utilizando espectrometria de massa, obtido para NDELA (aduto), para um nível de fortificação de 50,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ . Coluna: C18 XTerra <sup>TM</sup> . Fase móvel H <sub>2</sub> O/ACN com eluição gradiente numa vazão de 0,25 mL min <sup>-1</sup> . | <b>130</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>Figura IV.40</b> – Cromatograma, utilizando espectrometria de massa, obtido para NDMA para um nível de fortificação de 50,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ . Coluna: C18 XTerra <sup>TM</sup> . Fase móvel H <sub>2</sub> O/ACN com eluição gradiente numa vazão de 0,25 mL min <sup>-1</sup> . | <b>130</b> |
| <b>Figura IV.41</b> – Cromatograma, utilizando espectrometria de massa, para NMOR para um nível de fortificação de 50,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ . Coluna: C18 XTerra <sup>TM</sup> . Fase móvel H <sub>2</sub> O/ACN com eluição gradiente numa vazão de 0,25 mL min <sup>-1</sup> .        | <b>131</b> |
| <b>Figura IV.42</b> – Curva analítica obtida para o aduto da NDELA, no intervalo de concentração de 2,5 a 50,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ . Coluna: C18 XTerra <sup>TM</sup> . Fase móvel H <sub>2</sub> O/ACN com eluição por gradiente numa vazão de 0,25 mL min <sup>-1</sup> .             | <b>131</b> |
| <b>Figura IV.43</b> – Curva analítica obtida para a NDMA, no intervalo de concentração de 2,5 a 50,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ . Coluna: C18 XTerra <sup>TM</sup> . Fase móvel H <sub>2</sub> O/ACN com eluição por gradiente numa vazão de 0,25 mL min <sup>-1</sup> .                       | <b>132</b> |
| <b>Figura IV.44</b> – Curva analítica obtida para a NMOR, no intervalo de concentração de 2,5 a 50,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ . Coluna: C18 XTerra <sup>TM</sup> . Fase móvel H <sub>2</sub> O/ACN com eluição por gradiente numa vazão de 0,25 mL min <sup>-1</sup> .                       | <b>132</b> |
| <b>Figura IV.45</b> - Curva analítica para N-nitrosodietanolamina no intervalo de 0,1 a 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , utilizando LC-MS.  | <b>134</b> |
| <b>Figura IV.46</b> - Curva analítica para N-nitrosodimetilamina no intervalo de 0,1 a 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , utilizando LC-MS.   | <b>134</b> |
| <b>Figura IV.47</b> - Curva analítica para N-nitrosomorfolina no intervalo de 0,1 a 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , utilizando LC-MS.  | <b>135</b> |
| <b>Figura IV.48</b> – Cromatogramas característicos obtidos para a NDELA, NDMA e NMOR, na concentração de 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , utilizando LC-MS.  | <b>136</b> |
| <b>Figura IV.49</b> - Curva analítica para N-nitrosodietanolamina no intervalo de fortificação de 1 a 15 $\mu\text{g g}^{-1}$ , utilizando LC-MS.  | <b>138</b> |
| <b>Figura IV.50</b> - Curva analítica para N-nitrosodimetilamina no intervalo de fortificação de 1 a 15 $\mu\text{g g}^{-1}$ , utilizando LC-MS.   | <b>138</b> |
| <b>Figura IV.51</b> - Curva analítica para N-nitrosomorfolina no intervalo de fortificação de 1 a 15 $\mu\text{g g}^{-1}$ , utilizando LC-MS.  | <b>138</b> |

**Figura IV.52** - Curvas analítica para N-nitrosodimetilamina e N-nitrosomorfolina no intervalo de 0,5 a 2,5  $\mu\text{g g}^{-1}$ , utilizando LC-MS e gráficos de resíduos. **140**

---

---

## Prefácio

---

---

A

tese versa sobre métodos para a determinação de N-nitrosaminas em xampu.

O que motivou o desenvolvimento deste trabalho de tese foi a necessidade de métodos que permitam a determinação de N-nitrosaminas não voláteis e voláteis por um único método, assim como a falta de dados disponíveis sobre a possível presença de N-nitrosaminas em produtos de higiene e cosméticos comercializados no Brasil.

A princípio métodos eletroquímicos podem ser interessantes para este fim, desde que sejam associados à técnicas de separação. Muitos estudos existem sobre a redução de N-nitrosaminas sobre o eletrodo de mercúrio. No entanto, esse não é adequado para células em fluxo. O diamante dopado com boro apresenta características interessantes, entre essas, uma ampla janela de potencial, que a princípio permitiria oxidar as N-nitrosaminas. Sendo assim, um dos focos deste trabalho foi avaliar a possibilidade de empregar o diamante dopado com boro em uma célula amperométrica que pudesse ser acoplada a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência e permitisse a determinação de N-nitrosaminas. Em adição, foram também avaliados outros sistemas de detecção a fim de possibilitar uma comparação entre eles.

A tese está apresentada em cinco capítulos. No primeiro, **Capítulo I** – Introdução se apresenta uma revisão sobre N-nitrosaminas, desde os aspectos toxicológicos, ocorrência em produtos cosméticos e métodos analíticos; esse capítulo é parte do artigo CONTAMINAÇÃO DE PRODUTOS DE HIGIENE E COSMÉTICOS POR N-NITROSAMINAS publicado na Química Nova, 32(8), 2159-2168, 2009. O **Capítulo II** apresenta os objetivos da tese e o **Capítulo III** apresenta o estudo do comportamento eletroquímico de N-nitrosaminas sob eletrodo de diamante dopado com boro e confecção de um detector amperométrico para acoplamento em um cromatógrafo líquido de alta eficiência. O **Capítulo IV** descreve a determinação de N-nitrosaminas por cromatografia líquida

de alta eficiência acoplada a diversos tipos de detectores. O **Capítulo V** apresenta a conclusão geral do trabalho e o **Capítulo VI** as referências bibliográficas.

# **CAPÍTULO I**

## **Revisão Bibliográfica**





## I.1 - INTRODUÇÃO

As N-nitrosaminas são compostos N-nitrosos, considerados potentes carcinógenos, que podem estar presentes em uma grande variedade de produtos como alimentos, bebidas, medicamentos, amostras biológicas como saliva, sangue e tecidos; agrotóxicos, produtos de borracha, amostras ambientais como solo, água, efluentes e ar; cosméticos, entre outros.

As N-nitrosaminas tornaram-se objeto de intensivos estudos toxicológicos nos últimos cinquenta anos, mais precisamente a partir de 1954, quando os cientistas britânicos Magee e Barnes reportaram, de forma inédita, sobre a associação entre danos hepáticos em ratos e a N-nitrosodimetilamina (NDMA) (BARNES & MAGEE, 1954). Dois anos mais tarde, os mesmos pesquisadores confirmaram a indução de tumores hepáticos em ratos que foram alimentados com NDMA (MAGEE & BARNES, 1956).

Durante o período de 1957 a 1962, na Noruega, foi observado que animais alimentados com ração de peixe, a qual tinha sido adicionada de elevadas concentrações de nitrito, apresentaram desordens hepáticas e câncer. Estudos revelaram que a ração estava contaminada com NDMA, que foi formada a partir da nitrosação de aminas presentes na ração (ENDER *et al.*, 1964).

Durante a década de 60, muitos outros relatos ocorreram quanto à presença e formação de N-nitrosaminas em ração, o que motivou cientistas de todo mundo a investigar a presença destes compostos em outras matrizes, o que de fato se comprovou. N-nitrosaminas foram encontradas na cerveja comercializada na Alemanha e em diferentes tipos de alimentos, especialmente produtos cárneos curados.

A indústria de cosméticos não ficou de fora desta problemática e tomou ciência da possível presença de N-nitrosaminas em cosméticos em um Encontro da Sociedade Americana de Químicos (*American Chemical Society*), em 1977, quando foi reportada por Fine, pela primeira vez, a contaminação de produtos de higiene e cosméticos pela N-nitrosodietanolamina (NDELA) (FINE *et al.*, 1975).

Desde então, diversas N-nitrosaminas foram encontradas em cosméticos em todo mundo e o assunto continua sendo amplamente discutido.

## I.2 - PROPRIEDADES QUÍMICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DAS N-NITROSAMINAS

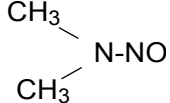
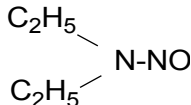
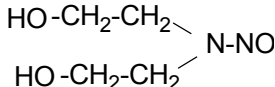
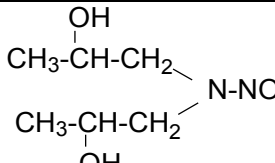
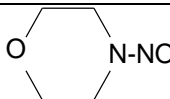
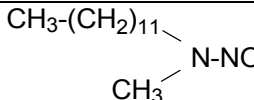
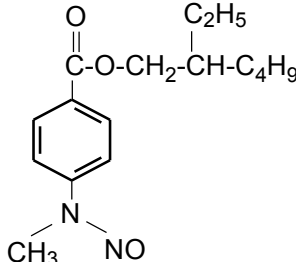
As N-nitrosaminas são compostos N-nitrosos alifáticos ou aromáticos que apresentam um grupo funcional nitroso ligado a um átomo de nitrogênio. As propriedades físico-químicas dependem dos radicais ligados ao átomo de nitrogênio, sendo que as N-nitrosaminas podem ser encontradas nas formas sólida, líquida ou gasosa (*MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD, GREAT BRITAIN, 1992*).

As N-nitrosaminas podem ser sintetizadas a partir do ácido nitroso e aminas secundárias. O primeiro relato da síntese de N-nitrosaminas data de 1853 (TELLING, 1982).

De modo geral, as N-nitrosaminas são estáveis em meios neutros e fortemente básicos e, portanto, uma vez formadas são dificilmente destruídas. No entanto, se decompõem lentamente quando expostas à radiação ultravioleta, formando aldeídos, nitrogênio e óxido nitroso, ou aminas e ácido nitroso (*MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD, GREAT BRITAIN, 1992; IKEDA & MIGLIORESE, 1990*). Em meio fortemente ácido ocorre clivagem do grupo nitroso, sendo que a reação pode ser catalisada pela presença de nucleófilos como iodeto, tiocianato, brometo e/ou cloreto. Um reagente comumente utilizado para destruir N-nitrosaminas é o ácido bromídrico em ácido acético glacial (IKEDA & MIGLIORESE, 1990).

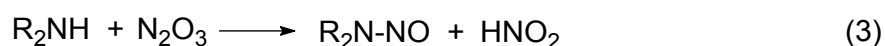
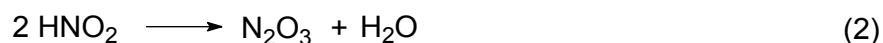
As estruturas das N-nitrosaminas mais comumente encontradas em cosméticos e produtos de higiene estão apresentadas na **Tabela I.1** (CAMEO CHEMICALS, 2010; NIOSH, 2008; MATYSKA *et al.*, 2000).

**Tabela I.1** – Estruturas químicas das N-nitrosaminas encontradas em produtos cosméticos

| N-Nitrosamina                                    | Abreviação | Estrutura Química  | CAS         | Massa Molar (g mol <sup>-1</sup> ) | Ponto de ebulição (°C) |
|--|------------|--|-------------|------------------------------------|------------------------|
| N-nitrosodimetilamina                            | NDMA       |     | 62-75-9     | 74,08                              | 151-153                |
| N-Nitrosodietilamina                             | NDEA       |    | 55-18-5     | 102,14                             | 177                    |
| N-nitrosodietanolamina                           | NDELA      |    | 1116-54-7   | 134,16                             | 114                    |
| N-nitrosodiisopropilamina                        | NDPrA      |    | 53609-64-6  | 162,20                             | 122-124                |
| N-Nitrosomorfolina                               | NMOR       |    | 59-89-2     | 116,14                             | 225-227                |
| N-Nitrosometildodecilamina                       | NMDDA      |  | 55090-44-3  | 228,37                             | 335                    |
| 2-Etilexil 4 - (N-nitroso-N-metilamino)-benzoato | NMPABAO    |  | 122021-01-6 | 292,37                             | 433                    |

As N-nitrosaminas são geralmente formadas e/ou sintetizadas pela reação de uma amina secundária com agentes nitrosantes, como nitrito. Mas também podem ser formadas a partir da nitrosação de aminas primárias ou terciárias.

O mecanismo envolvido na nitrosação de aminas secundárias pelo íon nitrito está apresentado a seguir (**Reações 1 a 3**). Na equação 4 está descrita a expressão da velocidade da reação global.



Uma vez que o agente nitrosante é formado a partir de duas moléculas de ácido nitroso, a reação total é de segunda ordem em relação à concentração deste. A reação de formação da N-nitrosamina depende do pH, uma vez que é favorecida quando a amina se encontra na sua forma não protonada (meio básico) e quando ocorre a formação do anidrido nitroso a partir do nitrito (favorecido em meio ácido). O pH ótimo de nitrosação em meio aquoso para aminas que apresentam um  $\text{pK}_a > 5$  é na faixa de 3,0 a 3,4; ou seja, próximo do  $\text{pK}_a$  do ácido nitroso. Para um mesmo pH, a velocidade de nitrosação da amina aumenta em função da diminuição da basicidade da mesma (MIRVISH, 1975; DOUGLAS *et al.*, 1978).

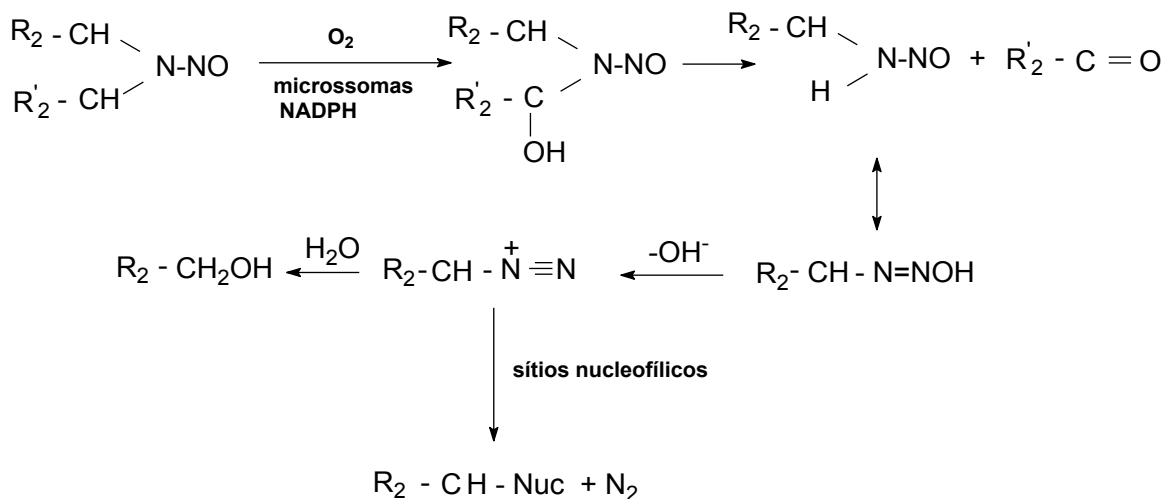
A reação de nitrosação de aminas secundárias pode ser catalisada por ânions nucleofílicos como tiocianato, cloreto, brometo e outros.

Como potentes inibidores da reação de nitrosação se destacam o ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, ácido sulfâmico, entre outros. Esses compostos competem com a amina pelo agente nitrosante (MIRVISH, 1975; DOUGLAS *et al.*, 1978; ARCHER *et al.*, 1976). As reações envolvidas serão discutidas mais adiante.

### I.3 - ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

Os compostos N-nitrosos e, em particular, as N-nitrosaminas, são considerados potentes carcinógenos, além de apresentarem ação teratogênica e mutagênica em animais de laboratório (BARTSH & MONTESANO, 1984; REYES & SCANLAN, 1984; ROCHE *et al.*, 1994). Efeitos carcinogênicos de N-nitrosaminas já foram observados em mais de 40 espécies de animais, inclusive em macacos (BARTSH & MONTESANO, 1984).

As N-nitrosaminas, de modo geral, requerem ativação metabólica para exercerem sua ação carcinogênica (**Figura I.1**). A primeira etapa da biotransformação envolve uma hidroxilação do carbono  $\alpha$  do grupo alquila, catalisada pela monooxigenase de função mista do Citocromo P<sub>450</sub>, principalmente o CYP2E1 e sua isoforma CYP2A6, formando um aldeído ou cetona e uma N-nitrosamina primária, instável, a qual tautomeriza para um alquildiazoidróxido. Este azoidróxido pode dar origem a um íon diazônio que pode levar a alquilação de sítios nucleofílicos do DNA, RNA e proteínas (MIRVISH, 1975). Esta biotransformação é considerada a etapa fundamental na iniciação do câncer.



**Figura I.1** - Biotransformação das nitrosaminas (adaptado da referência DOUGLAS *et al.*, 1978 e LOEPPKY, 1999).

No caso da NDELA, foi verificado que a  $\beta$ -oxidação é a principal via de disposição metabólica em roedores (BONFANTI *et al.*, 1991). A conversão da NDELA para N-nitroso-N-2-hidroxietilglicina ocorre via formação da N-nitroso(2-hidroxietil)-N(formilmetil)amina, a qual existe em equilíbrio com o seu hemiacetal cíclico, a N-nitroso-2-hidroximorfolina. A  $\beta$ -oxidação é catalisada preferencialmente pela aldeído desidrogenase nas frações microsossomais hepáticas (S9) de roedores do que pelas monooxigenases microsossomais (LOEPPKY, 1999)

A indução de tumores pode ocorrer em diferentes órgãos, dependendo da estrutura química da N-nitrosamina, da dose, da via de exposição e da espécie animal. Embora não existam evidências diretas da incidência de câncer em humanos, como resultado da exposição às N-nitrosaminas, presume-se que o homem também seja sensível à ação tóxica desses compostos (ROCHE *et al.*, 1994; PREUSSMANN & STEWART, 1984).

As N-nitrosaminas são absorvidas rapidamente no trato gastrointestinal e também através da pele (SWANN, 1975). A NDELA é absorvida pela pele e acumulada em órgãos como fígado, bexiga e outros, onde induz efeitos tóxicos crônicos. Dietanolamina e trietanolamina, comumente encontrada como matéria-prima de produtos cosméticos, não são consideradas carcinogênicas, mas podem causar irritação na pele e nas mucosas, além de servirem como precursoras da formação de N-nitrosaminas (MATYSKA *et al.*, 2000).

Embora muitas N-nitrosaminas avaliadas tenham sido consideradas carcinogênicas em animais de laboratórios, o efeito adverso causado pela presença desses compostos em produtos cosméticos depende de vários fatores, como: estrutura do composto, concentração, tipo de formulação cosmética, frequência de uso do produto, grau de absorção da N-nitrosamina pela pele e estabilidade frente à radiação UV (HAVERY & CHOU, 1994).

A NDELA é carcinogênica em ratos após administração oral e em hamsters após injeção subcutânea. Foram observados nos ratos carcinomas hepatocelulares e adenomas renais e nos hamsters, adenocarcinomas na cavidade nasal, tumores na traquéia, adenomas hepatocelulares e fibrosarcomas locais (IARC, 1978).

A N-nitrosomorfolina (NMOR) é carcinogênica em camundongos, hamsters e várias espécies de peixe. Foi observada, após administração oral, a formação de tumores malignos e benignos no fígado, pulmão e vasos sanguíneos em ratos. Além disso, foi verificado que a NMOR é carcinogênica após administração em uma única dose (IARC,1978).

A NDEA e a NDMA são carcinogênicas em todos os animais testados, entre esses: ratos, camundongos, hamsters, coelhos, macacos, peixes, sapos, porcos, cães e aves. Os principais órgãos afetados são o fígado, trato digestório e rins (IARC,1978).

## **I.4 - N-NITROSAMINAS EM PRODUTOS DE HIGIENE E COSMÉTICOS**

A palavra “cosmético” deriva da palavra grega *kosmetikós*, que significa “hábil em adornar”. Há milhares de anos homens e mulheres vêm utilizando cosméticos. Arqueólogos encontraram em túmulos egípcios de aproximadamente 3.500 a.C. sinais do uso de pintura para os olhos e unguentos aromáticos (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Cosmético>, 2010).

Muitos estudos foram conduzidos após a primeira confirmação da presença de NDELA em cosméticos, em 1977, e depois de comprovado o potencial de nitrosação de várias matérias-primas empregadas na indústria cosmética. Em alguns casos, as N-nitrosaminas são formadas pela nitrosação de componentes primários de matéria-prima, enquanto, em outras situações a presença é decorrente da matéria-prima contaminada por amins nitrosáveis. Entre as amins nitrosáveis em cosméticos destacam-se os emulsificadores: trietanolamina e dietanolamina. Embora a reação de nitrosação da trietanolamina seja mais lenta, por ser uma amina terciária, esse emulsificador muitas vezes contém como contaminante a dietanolamina, amina secundária facilmente nitrosável (HAVERY & CHOU, 1994).

Entre os possíveis agentes nitrosantes em cosméticos destacam-se os conservantes *gem*-nitroalogenados como o 2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol

(Bronopol®) e o 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxano (Bronidox®). Tem sido verificada a formação da NDELA a partir da liberação de nitrito destes conservantes com posterior reação com dietanolamina ou trietanolamina (ROSENBERG *et al.*, 1980; CHOU, 1998).

Mais de 8000 matérias-primas são usadas na formulação de produtos cosméticos. Muitas destas são potenciais fontes da formação de N-nitrosaminas, entre essas, amidas, alcanolaminas, alcanolamidas de ácido graxos, óxidos de amina e aminas. Essas matérias-primas têm as funções de: espessantes, umectantes, emolientes, tensoativos, estabilizadores de espuma, hidratantes, lubrificantes, protetores de pele e antiirritantes. De modo geral, as matérias-primas usadas na indústria cosmética variam em grau de pureza e, assim, algumas trietanolaminas podem conter dietanolaminas em uma porcentagem que chega até 15%. A amina secundária pode sofrer nitrosação e, assim, ser responsável pela presença de N-nitrosaminas na formulação (HAVERY & CHOU, 1994).

Como potenciais agentes nitrosantes em cosméticos destacam-se o nitrito, óxidos de nitrogênio, alquil nitritos e nitrocompostos. Nitritos podem estar presentes como contaminantes em matérias-primas de cosméticos como resultado de estocagem em recipientes tratados com nitrito ou como impureza resultante de reações de nitração durante o processo de síntese. Um estudo realizado com quatorze diferentes matérias-primas orgânicas revelou que 14% de um total de 114 amostras continham nitrito em uma concentração superior a  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Matérias-primas inorgânicas e pigmentos usados como ingredientes em cosméticos também podem ser fontes de nitrito em produtos acabados. Em um estudo realizado com 63 matérias-primas inorgânicas, o nitrito foi encontrado em 70% das amostras analisadas em níveis de concentração acima de  $1 \text{ mg kg}^{-1}$ . Entretanto, foi verificado que o nitrito proveniente de pigmentos inorgânicos não contribui significativamente para formação de N-nitrosaminas em produtos cosméticos (HAVERY & CHOU, 1994).

O 2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol libera nitrito lentamente com o tempo e, portanto, é um agente nitrosante *in situ* em produtos cosméticos contendo esse conservante.



Óxidos de nitrogênio, presentes normalmente no ar, especialmente em ar poluído, são também considerados potentes agentes nitrosantes em cosméticos. O anidrido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) e dióxido de dinitrogênio ( $\text{N}_2\text{O}_4$ ) são capazes de nitrosar aminas em condições alcalinas e o  $\text{NO}_2$  é prontamente absorvido do ar pela trietanolamina. Uma vez o cosmético aplicado na pele, a água da emulsão cosmética evapora, deixando essencialmente uma camada não aquosa. O óxido de nitrogênio, facilmente absorvido por matrizes não polares, pode nitrosar aminas presentes na formulação e ser responsável pela formação de N-nitrosaminas *in situ* (HAVERY & CHOU, 1994).

Estudos adicionais sugerem que outros agentes nitrosantes podem se formar em produtos cosméticos a partir de reações de componentes das matérias-primas, como alcanolaminas, com nitrito ou óxidos de nitrogênio para produzir alquil nitritos. Alquil nitritos são efetivos agentes nitrosantes, mesmo em condições não ácidas (HAVERY & CHOU, 1994).

A formação de N-nitrosaminas em matrizes cosméticas é complexa porque muitas formulações são constituídas de emulsões, ou seja, contendo uma fase aquosa e outra não aquosa (oleosa). Enquanto aminas como dietanolamina e trietanolamina e também nitrito são solúveis na fase aquosa, alcanolamidas ácidas de cadeias longas e óxidos de nitrogênio são encontrados na fase oleosa. Isto sugere que exista provavelmente mais de um mecanismo que explique a formação de N-nitrosaminas em matrizes cosméticas, dependendo fundamentalmente dos precursores e de suas solubilidades relativas em cada fase (HAVERY & CHOU, 1994).

Estudos realizados por Powell (1987) evidenciaram que a trietanolamina, contendo aproximadamente 15% de dietanolamina, não é nitrosada pelo nitrito para formar N-nitrosodietanolamina em sistemas não aquosos. Entretanto, seguindo com a adição de ácido esteárico, ocorre a formação de NDELA. Neste caso, o ácido esteárico interage com o nitrito carregando o agente nitrosante para a fase não aquosa. Pelas mesmas razões, a nitrosação de óleos solúveis trietanolamina-estearato ocorrem mais rapidamente em solventes não polares. A

presença de surfactantes também afeta a nitroação de aminas em sistemas de emulsão, pelo fato de alterarem a distribuição dos precursores nas duas fases.

Apesar da velocidade de nitroação em matrizes cosméticas ser muitas vezes lenta, é importante considerar que os produtos cosméticos podem permanecer estocados por um extenso período de tempo e que durante esse período a reação, desde que contenha os precursores presentes, continua se processando. A reação pode ser acelerada pela temperatura.

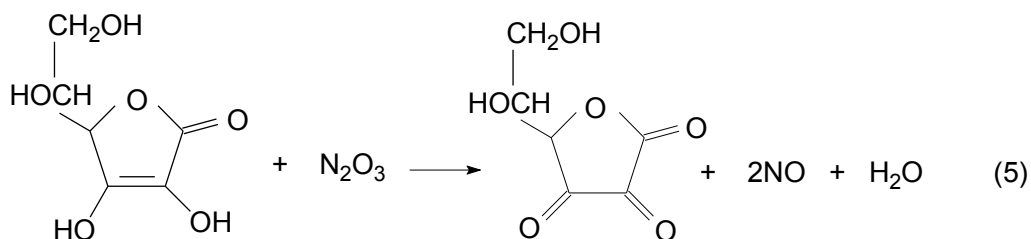
Um protetor solar contendo como ingrediente ativo o 2-etilexil-4-(N,N-dimetilamino) benzoato (Padimato O) e 2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol foi analisado em 1987, sendo que não foi detectada a presença de N-nitrosaminas nesta ocasião. Quando o mesmo produto foi analisado após três anos, apresentou uma concentração de  $8 \text{ mg kg}^{-1}$  de N-nitrosaminas derivadas de uma amina secundária tipicamente encontrada no Padimato O. Portanto, os produtos que podem ser expostos ao sol e temperatura podem levar à formação de elevados níveis de N-nitrosaminas durante o período de estocagem. Produtos sazonais como protetores solares que não são vendidos até o final do verão podem ser estocados até o ano seguinte e as condições de armazenamento podem afetar os níveis de N-nitrosaminas nestes produtos (HAVERY & CHOU, 1994).

Além desses fatores, também existem compostos que tem a habilidade de catalisar reações de nitroação, como é o caso de ânions nucleofílicos, entre esses, tiocianato, cloreto e brometo. A velocidade de nitroação é dependente da basicidade da amina. Assim sendo, a velocidade de nitroação, na presença do catalisador, é incrementada para as aminas fracamente básicas (ARCHER, 1976). Ainda, foi verificado que a nitroação de dialquilaminas de cadeia longa pode ser aceleradas pela presença de surfactantes que formam agregados micelares. A extensão do efeito catalítico depende do tamanho da cadeia da amina, uma vez que estas se tornam mais solúveis na fase micelar à medida que a cadeia aumenta. O aumento da velocidade de nitroação pode ser explicado, em parte, através das interações eletrostáticas na superfície da micela, as quais desestabilizam a amina protonada em relação a sua forma livre, assim como

também pela maior solubilidade do agente nitrosante (anidrido nitroso) na fase micelar (ARCHER, 1976).

Produtos cosméticos são geralmente protegidos contra contaminação por bactérias e fungos, através da adição de conservantes que podem ou não liberar formaldeídos. Geralmente o pH do meio se encontra na faixa de 6 a 8. O conservante 2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol tem sido extensivamente avaliado a cerca do seu papel na formação de N-nitrosaminas (HOLLAND, 1981) visto que, em meio alcalino, o composto sofre decomposição liberando formaldeído e nitrito (COSMETIC INGREDIENT REVIEW PANEL, 1984). Foi comprovada a formação de NDELA a partir da presença de dietanolamina em pH 6 (ONG & RUTHERFORD, 1980).

No entanto, a formação de N-nitrosaminas pode ser inibida com a adição de inibidores de nitrosação à formulação cosmética como: ácido sulfâmico, sulfamato de amônio, ácido tânico,  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico, entre outros. Os inibidores reduzem rapidamente o agente nitrosante. Entre os inibidores, o ácido ascórbico tem sido o mais estudado. A reação envolvida está apresentada a seguir (5):



Uma vez que o NO pode ser reoxidado pelo ar atmosférico ao anidrido nitroso, é importante que um excesso de ácido ascórbico seja adicionado para inibir a nitrosação em sistemas que sejam expostos ao ar (DOUGLAS *et al.*, 1978).

Alguns estudos têm identificado inibidores de nitrosação eficazes para produtos cosméticos. Para emulsões cosméticas são necessários inibidores para as fases hidrofóbicas e hidrofílicas, para garantir que a inibição seja eficiente em ambas às fases. Muitos inibidores solúveis em água têm sido avaliados, incluindo

ácido ascórbico, ascorbato de sódio, sorbato de potássio, bissulfito de sódio e propil galato (ONG & RUTHERFORD, 1980; SCHMELTZ & WENGER, 1979; ROSENBERG, 1981; KABACOFF *et al.*, 1984; FELLION, 1980). Os inibidores solúveis em óleo, que têm sido investigados, incluem butil-hidroxitolueno (BHT), butil-hidroxianisol,  $\alpha$ -tocoferol, e ascorbil palmitato (ROSENBERG, 1981; KABACOFF *et al.*, 1984, DUNNETT & TELLING, 1984). Ácido ascórbico e bissulfito de sódio foram os mais eficientes, inibindo a nitrosação em praticamente 99%. Butil-hidroxitolueno,  $\alpha$ -tocoferol, ascorbato de sódio e ascorbil palmitato foram inibidores eficazes em alguns casos, mas não em todos os sistemas estudados.

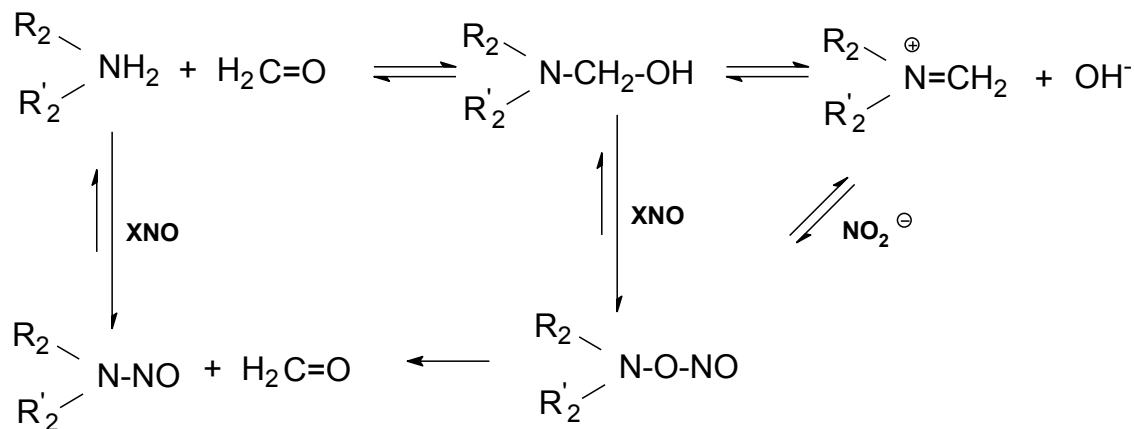
A ação inibidora do ácido ascórbico sobre a reação de nitrosação de aminas foi descoberta acidentalmente na formulação do analgésico aminopirina, quando foi impedida a formação de NDMA. Posteriormente, foi observado que esta vitamina inibia fortemente a formação de compostos N-nitrosos a partir da maioria das aminas e amidas (MIRVISH *et al.*, 1972). Também foi verificado que a administração conjunta de ácido ascórbico e aminas ou amidas em animais inibe os efeitos hepatotóxicos, carcinogênicos e teratogênicos provenientes da síntese endógena de N-nitrosaminas ou N-nitrosamidas (WALTERS, 1992).

Para garantir a diminuição da formação de N-nitrosaminas nos produtos cosméticos é importante que sejam tomados cuidados como: redução do uso de agentes nitrosantes responsáveis pela formação de N-nitrosaminas como nitrito, gases nitrosos ( $\text{NO}_x$ ) e/ou conservantes que liberam nitrito (compostos *gem*-nitroalogenados); substituição de aminas facilmente nitrosáveis por outras aminas que são menos facilmente nitrosáveis, por exemplo aminas primárias (KEEFER & HANSEN, 1982) e controle da matéria-prima quanto à presença de N-nitrosaminas.

Dunnett e Telling (DUNNETT & TELLING, 1984) realizaram um estudo para avaliar a eficiência do butil-hidroxitolueno,  $\alpha$ -tocoferol e ascorbato em inibir a formação de N-nitrosaminas em cosméticos que continham 0,01% do conservante 2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol. Os autores verificaram que a adição de 0,01% de butil-hidroxitolueno, 0,01% de ascorbato e 0,2% de  $\alpha$ -tocoferol no cosmético que

continha 0,05% de 2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol inibe a formação de NDELA (concentração menor que  $2,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Ainda, uma vez que o ascorbato ou butil-hidroxitolueno, em concentrações elevadas, provocam o escurecimento do produto cosmético, devido à oxidação, é recomendado que o teor de 2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol adicionado seja menor do que 0,01% e seja usado  $\alpha$ -tocoferol em uma concentração de 0,2% ou butil-hidroxitolueno de 0,02 a 0,1%.

Challis e colaboradores estudaram a cinética de nitrosação da morfolina em meio aquoso (pH 5-7) na presença de nitrito e formaldeído e verificaram que o processo segue quatro rotas distintas (**Figura I.2**). Três rotas envolvem uma nitrosação eletrofílica da amina neutra ou N-hidroximetilamina, formada previamente pela reação da amina com formaldeído. A outra possibilidade envolve uma reação nucleofílica do íon nitrito com um íon imínio derivado da N-hidroximetilamina. Sendo assim, é necessário que dois tipos de inibidores sejam adicionados aos cosméticos para inibir de forma eficiente a formação de N-nitrosaminas: um composto seqüestrador de XNO (antioxidantes) e um composto que reaja com o íon imínio (composto nucleofílico) (CHALLIS *et al.*, 1995).



**Figura I.2** – Reações de formação de N-nitrosaminas catalisadas por formaldeído (adaptado da referência Challis *et al.*, 1995).

## **I.5 - OCORRÊNCIA DE N-NITROSAMINAS EM PRODUTOS COSMÉTICOS**

Devido à grande variedade de aminas contidas nas matérias-primas que são utilizadas em produtos de higiene e cosméticos, existe a possibilidade da formação de diversas N-nitrosaminas, se agentes nitrosantes estiverem presentes. Estudos realizados comprovaram que cosméticos que continham elevados níveis de N-nitrosaminas também continham elevados níveis de agentes nitrosantes. No entanto, não existe correlação consistente entre o total de agentes nitrosantes e níveis de N-nitrosaminas encontrados (HAVERY & CHOU, 1994).

Tem sido destacado o número de trabalhos publicados a respeito do teor de N-nitrosaminas em produtos de higiene e cosméticos, sendo que a maioria deles relaciona-se com o teor de NDELA, NMOR e NDMA nestes produtos (MATYSKA *et al.*, 2000). Cabe ressaltar que a maioria dos dados foram publicados nas décadas de 80 e 90. No entanto, os poucos artigos publicados nos últimos cinco anos indicam que o problema ainda não foi resolvido e que ainda se encontram no mercado cosméticos contaminados com N-nitrosaminas.

Um estudo realizado pela agência Norte Americana FDA (*Food and Drug Administration*), no período de 1978 a 1980, detectou NDELA em 110 de 252 produtos contendo trietanolamina na formulação e 25 de 64 produtos não contendo essa amina terciária (BEYER *et al.*, 1983).

Estudos realizados por Spiegelhalder e Preussmann com produtos comercializados na Alemanha comprovaram a contaminação de um número considerável de produtos de higiene e cosméticos por N-nitrosaminas. De 145 amostras analisadas, 50 (34,5%) continham NDMA, enquanto que 26 (18%) continham NMOR. A quantidade máxima encontrada para NDMA foi de  $24 \mu\text{g kg}^{-1}$  e para NMOR foi de  $640 \mu\text{g kg}^{-1}$ , ambas em amostras de xampu. Apenas em 3 amostras foram encontradas outras N-nitrosaminas de baixa massa molar: N-nitrosodietilamina ( $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) em uma amostra de creme para banho e ambas N-nitrosodi-*n*-propilnitrosamina ( $35 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) e N-nitrosodi-*n*-butilnitrosamina ( $15 \mu\text{g}$

kg<sup>-1</sup>) foram detectadas em uma amostra de espuma para banho. A NDELA foi encontrada em 25 amostras (17%), sendo a maior concentração (1400 µg kg<sup>-1</sup>) encontrada numa amostra de produto infantil para banho (SPIEGELHALDER & PREUSSMANN, 1984).

Em outro estudo foram avaliados cosméticos comercializados na Alemanha no ano de 1986 e foi verificado que 40% estavam contaminados com NDELA em concentrações variando de 7 a 2000 µg kg<sup>-1</sup>. Depois do Ministério da Saúde da Alemanha (BGA, *Bundesgesundheitsamt*) ter recomendado o não uso de aminas secundárias em cosméticos, um novo estudo foi realizado, em 1987, onde foi verificado que apenas 13% dos produtos cosméticos disponíveis no mercado da Alemanha continham NDELA em concentrações na faixa de 10 a 235 µg kg<sup>-1</sup> (EISENBRAND *et al.*, 1991).

Em outro trabalho foi relatada a contaminação de cosméticos por NDELA em uma concentração de até 47000 µg kg<sup>-1</sup> (FAN *et al.*, 1977; KLEIN *et al.*, 1981).

Na análise de protetores solares (loções) comercializados em Israel foi verificada a presença de NDELA em 3 das 20 amostras analisadas em uma concentração na faixa de 17 a 27 µg kg<sup>-1</sup> (WESTIN *et al.*, 1990).

Em pesquisa realizada com cosméticos incluindo géis, loções, xampus, cremes, condicionadores e espumas para banho disponíveis no mercado holandês foram constatadas a presença de NDELA em níveis de 46 a 7644 µg kg<sup>-1</sup>, sendo que os níveis mais altos foram encontrados em amostras de gel para cabelo, seguido das amostras de gel de banho (SCHOTHORST & STEPHANY, 2001).

No entanto, níveis bem menores foram detectados por Wang e colaboradores em amostras de xampu, espuma de banho e cremes para pele. A média dos valores encontrados foi de 1,26; 1,49; 3,43; e 2,49 mg L<sup>-1</sup> para N-nitrosodietanolamina (NDELA), N-nitroso-bis-(2-hidroxipropilamina (NBHPA), N-nitrosodi-*n*-propilamina (NDPLA) e N-nitrosodifenilamina (NDPHLA), respectivamente (WANG *et al.*, 2006).

Embora alguns produtos não apresentem contaminação por N-nitrosaminas, foi verificado que produtos estocados por certos períodos podem levar à formação desses compostos. Matyska e colaboradores (MATYSKA *et al.*,

2000) verificaram a presença de NDELA em cosméticos estocados por 5 e 15 anos.

## I.6 - ASPECTOS DE LEGISLAÇÃO

As estruturas que regulam os cosméticos diferem significativamente entre os países e estão longe de estarem harmonizados. De modo geral, os produtos cosméticos estão sujeitos a controles regulatórios em todos os países, visando garantir a segurança de uso dos produtos e evitar efeitos adversos sobre a saúde dos consumidores. É importante destacar que a falta de harmonização entre os mercados pode levar a barreiras alfandegárias (EC, 2004).

Enquanto produtos específicos podem ser incluídos na categoria de cosméticos em um país, em outros o mesmo produto pode ser classificado como medicamento, *quasi*-medicamento (*quasi-drug*) ou até mesmo medicamento vendido sem prescrição médica (OTC, *over-the-counter drug*) (**Tabela I.2**).

De acordo com a classificação, os produtos estão sujeitos a diferentes regimes regulatórios, o que pode alterar desde os requerimentos para sua aprovação, até limitar o uso de determinados ingredientes na sua formulação.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), “Cosméticos, Produtos de Higiene e Perfumes são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los ou mantê-los em bom estado”. (Anexo I da Resolução 211 – DOU 14/07/05 - ANVISA). Estes são classificados, de acordo com os artigos 3º e 26º da Lei 6.360/76 e artigos 3º, 49º e 50º, do Decreto 79094/77 (ANVISA, página acessada em setembro de 2008). Os produtos cosméticos estão enquadrados em quatro categorias: 1- Produtos de higiene; 2- Cosmético; 3- Perfume e 4- Produto de uso infantil. São classificados quanto ao grau de risco que oferecem: Grau 1 - Produtos com risco mínimo e Grau 2 - Produtos com risco potencial. Os critérios



para essa classificação foram definidos em função da finalidade de uso do produto, áreas do corpo abrangidas, modo de usar e cuidados a serem observados, quando de sua utilização (Resolução nº 79, de 28 de agosto de 2000 - ANVISA).

Na Comunidade Européia a estrutura regulatória é fornecida pela Diretiva 76/768/EEC e de seus subseqüentes adendos. A regulação de substâncias é baseada em listas positivas e negativas (EC, 2004).

A legislação americana (FD&C Act, *Food, Drugs and Cosmetic Act*) define duas categorias: cosméticos e medicamentos, incluindo na última categoria também os OTC.

**Tabela I.2** – Exemplos de categorias de produtos comercializados em diferentes países (EC, 2004; ANVISA, 2008)

| <b>Produto</b>   | <b>Brasil</b>                  | <b>Comunidade<br/>Européia</b>         | <b>Estados<br/>Unidos</b> | <b>Canadá</b>                        | <b>Japão</b>          |
|------------------|--------------------------------|--|---------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| Sabonete líquido | produto de<br>higiene, grau I  | cosmético                              | cosmético                 | cosmético                            | cosmético             |
| Protetor solar   | cosmético, grau II             | cosmético, sujeito<br>a lista positiva | OTC                       | medicamento sem<br>prescrição médica | cosmético             |
| Antitranspirante | produto de<br>higiene, grau II | cosmético                              | OTC                       | medicamento sem<br>prescrição médica | quasi-<br>medicamento |
| Batom            | cosmético, grau I              | cosmético                              | cosmético                 | cosmético                            | cosmético             |
| Loção anti-acne  | cosmético, grau II             | medicamento                            | OTC                       | medicamento sem<br>prescrição médica | quasi-<br>medicamento |

OTC: *Over-the-counter drug*.

Em 1979, o FDA dos Estados Unidos publicou uma portaria solicitando às indústrias ações para reduzir os níveis de NDELA em produtos de uso pessoal. Estas indústrias foram obrigadas a tomar medidas imediatas para eliminar a possível existência de NDELA e outras N-nitrosaminas em produtos cosméticos (FDA). Mais tarde, o Ministério da Saúde na Alemanha (*BGA, Bundesgesundheitsamt*), em 1987, também publicou várias recomendações para a indústria cosmética no intuito de reduzir os níveis de N-nitrosaminas presentes nos produtos. Estas recomendações consideravam que aminas secundárias não deveriam ser utilizadas nesses produtos. Ácido graxos de dietanolamidas deveriam conter um teor menor possível de dietanolamina, a pureza da trietanolamina deveria ser maior que 99%, e que todos esses produtos deveriam conter menos de 1% de dietanolamina, menos de 0,5% de monoetanolamina e menos de 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de NDELA (*BUNDESGESUNDHEITSAMT*, 1987).

Já em 1992, a Comissão Europeia publicou diretrizes legais para restringir a ocorrência de N-nitrosaminas em cosméticos e regulamentar a pureza da matéria-prima. A diretiva 92/86/EEC preconiza que os produtos cosméticos devem ser ausentes de N-nitrosaminas e a matéria-prima não deverá conter mais do que 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de NDELA (*COMMISSION DIRECTIVE 92/86/EEC*, 1992).

No entanto, atualmente, diretrizes das agências reguladoras como ANVISA e da Comunidade Europeia apenas estabelecem valores limites de contaminantes, entre esses N-nitrosaminas, em matérias-primas destinadas à formulação de produtos de higiene ou cosméticos. O valor máximo permitido de N-nitrosaminas em matérias-primas é de 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Não existem recomendações para um limite máximo de resíduo aceitável de N-nitrosaminas em produtos acabados.

A **Tabela I.3** apresenta algumas recomendações, seguidas hoje em dia, pelas indústrias de produtos cosméticos, com relação às matérias-primas que são os principais precursores de N-nitrosaminas (ANVISA, 2008; *COMMISSION DIRECTIVE 92/86/EEC*, 1992).

Como pode ser observado, não existem dados a respeito do teor máximo de N-nitrosaminas permitida para produtos cosméticos. Em outros países medidas preventivas foram tomadas baseadas nos resultados obtidos que indicaram a

presença de N-nitrosaminas em diferentes formulações cosméticas. No Brasil, não existem dados disponíveis que tenham sido publicados, o que reforça a necessidade de estudos com relação à presença desses compostos presentes em cosméticos comercializados no Brasil.

**Tabela I.3** - Especificação para presença de amins em matéria-prima de produtos cosméticos (ANVISA, 2008; COMMISSION DIRECTIVE 92/86/EEC, 1992)

| Substância  | Concentração máxima autorizada<br>no produto final   | Exigências   |
|---|--|--|
| Dialquilamidas e<br>dialcanolamidas de ácidos<br>graxos | Teor máximo de amins<br>secundárias: 0,5%  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Não usar com sistemas nitrosantes</li> <li>- Teor máximo de amins secundárias em matérias-primas: 5%</li> <li>- Teor máximo de N-nitrosaminas: 50 µg kg<sup>-1</sup></li> <li>- Embalar/conservar em recipientes livres de nitrito</li> </ul>                                 |
| Monoalquilaminas,<br>Monoalcanolaminas e seus<br>sais   | Teor máximo de amins<br>secundárias: 0,5%  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Não usar com sistemas nitrosantes</li> <li>- Teor máximo de amins secundárias em matérias-primas: 5%</li> <li>- Teor máximo de N-nitrosaminas: 50 µg kg<sup>-1</sup></li> <li>- Embalar/conservar em recipientes livres de nitritos.</li> <li>- Pureza mínima: 99%</li> </ul> |
| Trialkilaminas,<br>trialcanolaminas e seus sais         | Se presente em produtos sem<br>enxágüe, limite de 2,5%; para outros<br>produtos não há limite. | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Não usar com sistemas nitrosantes</li> <li>- Teor máximo de amins secundárias em matérias-primas: 5%</li> <li>- Teor máx. de N-nitrosaminas: 50 µg kg<sup>-1</sup></li> <li>- Embalar/conservar em recipientes livres de nitritos</li> <li>- Pureza mínima: 99%</li> </ul>    |

## I.7 - MÉTODOS ANALÍTICOS

Diversos métodos analíticos foram empregados no passado para a determinação semi-quantitativa e quantitativa de N-nitrosaminas em matrizes diversas, incluindo a cromatografia em camada delgada, espectrofotometria, colorimetria e polarografia (YOUNG, 1978; HASEBE & OSTERYOUNG, 1975; WALTERS *et al.*, 1970). A matriz mais estudada foi o alimento, principalmente os produtos cárneos curados. Os métodos analíticos destinados para a determinação de N-nitrosaminas em produtos cárneos foram revisados recentemente por Rath e Reyes (RATH & REYES, 2008) e Dutra e colaboradores (DUTRA *et al.*, 2007).

O método colorimétrico clássico para a determinação de N-nitrosaminas envolve a reação de Griess. A reação envolve a clivagem química da ligação N-NO e reação do agente nitrosante com uma amina aromática formando um sal de diazônio. Esse, por sua vez, na presença de outra amina aromática secundária, forma um azo composto que absorve na região do visível do espectro eletromagnético (FOX, 1979). Essa reação é limitada às concentrações de N-nitrosaminas na ordem de  $\text{mg kg}^{-1}$  e está sujeito a interferências da matriz (IKEDA & MIGLIORESE, 1990).

No entanto, todos esses métodos careciam de detectabilidade e não permitiam a determinação de N-nitrosaminas ao nível de traços. Essa foi uma limitação no século passado, logo quando foi evidenciada a contaminação de diversos produtos por N-nitrosaminas, principalmente alimentos. Apenas com o desenvolvimento de métodos cromatográficos associados a diferentes sistemas de detecção, sensíveis e seletivos, essa limitação foi superada e métodos confiáveis puderam ser estabelecidos.

Para fins analíticos, as N-nitrosaminas são divididas em voláteis e não voláteis. Tais compostos incluem dialquilnitrosaminas de cadeia longa, N-nitrosopeptídeos e N-nitrosoderivados de bases orgânicas. As diferenças nas propriedades físico-químicas desses compostos dificultam o estabelecimento de métodos analíticos de aplicação geral (WALTERS, 1992).

Devido à confirmação da presença de NDMA em alimentos e bebidas, na

década de 70, os primeiros métodos desenvolvidos foram focados na determinação de N-nitrosaminas voláteis em alimentos. De modo geral, esses métodos eram baseados na extração das N-nitrosaminas da matriz alimento por destilação a vácuo ou óleo mineral e quantificação por cromatografia a gás (GC) associada a detectores como: ionização por chama (FID), termoiônico (TIC), condutividade eletrolítica de Coulson (CECD) e captura de elétrons (ECD). Mais tarde, foi desenvolvido o detector de quimiluminescência (TEA, *Thermal Energy Analyzer*) por Fine e colaboradores (FINE *et al.*, 1975), que acabou se tornando o detector de primeira escolha por muitos anos para fins quantitativos, devido à sua seletividade e detectabilidade e até hoje tem tido aplicação. O emprego deste sistema de detecção permitia simplificar o preparo de amostras.

Indubitavelmente, pelos motivos históricos apresentados, os métodos destinados à determinação de N-nitrosaminas voláteis tiveram uma maior atenção dos cientistas e, portanto, pode-se afirmar que, além de um maior número de artigos científicos publicados os métodos para essa finalidade tiveram um maior avanço. O mesmo não ocorreu com os métodos voltados para a determinação de N-nitrosaminas não voláteis. Um dos problemas no início era a associação do detector TEA ao sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Um segundo problema era o preparo de amostras, uma vez que seria necessária a quantificação de concentrações ao nível de  $\mu\text{g kg}^{-1}$  em matrizes complexas.

Basicamente, o detector TEA é composto por um pirolisador catalítico, uma armadilha, uma câmara de reação e um tubo fotomultiplicador. O princípio consiste na clivagem da ligação N-NO da N-nitrosamina no pirolisador catalítico, no qual é formado o radical nitrosila ( $\text{NO}\cdot$ ). Os subprodutos são removidos na armadilha. Por sua vez, o radical nitrosila, por intermédio de vácuo, é conduzido para a câmara de reação, na qual é oxidado na presença de ozônio para dióxido de nitrogênio no estado excitado ( $\text{NO}_2^*$ ). Quando a molécula decai para o seu estado fundamental, ocorre liberação de energia em um comprimento de onda de 600 nm. Essa radiação é detectada no tubo fotomultiplicador, sendo que a intensidade da radiação é proporcional à concentração da N-nitrosamina. A detectabilidade do detector TEA se situa ao nível de pg. Mesmo considerando a seletividade e

detectabilidade do detector TEA, se faz necessário a confirmação de identidade do analito por espectrometria de massas.

### **I.7.1 - Métodos Cromatográficos**

Atualmente, os métodos mais importantes para a determinação de N-nitrosaminas em matrizes complexas, entre essas os cosméticos, envolvem a cromatografia líquida ou a gás associada à espectrometria de massas. Também, existem métodos que empregam a HPLC associada a detectores UV-Vis ou de arranjo de diodos, com e sem derivatização pós-coluna.

Flower e colaboradores (FLOWER *et al.*, 2006) desenvolveram um método usando a HPLC em fase reversa para a determinação de NDELA em produtos de higiene. A detecção foi realizada em 540 nm, após clivagem fotolítica da ligação N-NO e reação do nitrito formado com o reagente de Griess (sulfanilamida e N-1-naftiletilenodiamina).

Vohra e Harrington (VOHRA & HARRINGTON, 1981) descreveram um método para a determinação de NDELA em cosméticos usando a HPLC associada a um detector polarográfico.

Outro método, para determinação de NDELA, utilizando a HPLC com detecção UV foi desenvolvido por Fellion e colaboradores. O método consistia na separação da NDELA utilizando uma coluna  $\mu$  Bondapak C18, fase móvel água destilada num fluxo de 0,4 – 0,6 mL min<sup>-1</sup> e detecção em 254 nm (FELLION *et al.*, 1980).

Lin e colaboradores desenvolveram um método para determinação de NDELA em cosméticos utilizando a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). A separação cromatográfica se deu utilizando uma coluna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) e como fase móvel 100% metanol numa vazão de 0,3 mL min<sup>-1</sup>. A detecção por espectrometria de massas foi realizada utilizando ionização por *electrospray* no modo positivo e os íons monitorados por MRM (*multiple reaction monitoring*). A faixa linear foi de 0 a 1000 ng mL<sup>-1</sup>, com linearidade de 0,9996 e limite de detecção de 0,2  $\mu$ g kg<sup>-1</sup> (S/N =



3). A recuperação em três níveis foi de 81 a 103% ( $n = 6$ ) e o coeficiente de variação foi inferior a 10% (LIN *et al.*, 2006).

Recentemente, Wang e colaboradores desenvolveram outro método para determinação de NDELA em cosméticos utilizando LC-MS. O método baseia-se na extração e *clean-up* das amostras utilizando cartuchos de extração em fase sólida C18 ou extração líquido-líquido, utilizando diclorometano, para amostras não solúveis em água. Como padrão interno foi utilizado d8-NDELA. A faixa linear do método foi de 5,0 a 80 ng mL<sup>-1</sup>, o limite de detecção alcançado foi de 50 µg kg<sup>-1</sup> e a recuperação apresentou uma faixa de 85% a 104% (WANG *et al.*, 2010).

No caso de N-nitrosaminas não voláteis, como o caso da NDELA, reações de derivatização podem ser empregadas para permitir a determinação por cromatografia a gás. Entre os reagentes derivatizantes têm sido empregados o anidrido acético e N-metilbistrifluoroacetamida (COLLIER *et al.*, 1988).

Os principais métodos para quantificação de N-nitrosaminas em cosméticos e produtos de higiene estão sumarizados na **Tabela I.4**.

**Tabela I.4** – Trabalhos publicados sobre a determinação de N-nitrosaminas em produtos cosméticos e matérias-primas

| Analito         | Matriz  | Técnica          | Fase estacionária  | Fase móvel   | Faixa linear [LOD/LOQ]                                   | Referência                         |
|-----------------|---|------------------|--|--|--|------------------------------------|
| NDELA           | Cremes e gel de limpeza para área dos olhos   | GC-ECD           | 3% OV-225 em Supelcoport (100-120 mesh)  | Argônio/metano (95:5 v/v)  | 0-400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ [NI/50 $\text{ng mL}^{-1}$ ] | (ROLLMANN <i>et al</i> , 1981)     |
| NDELA           | Produtos cosméticos   | HPLC-TEA         | Partisil 10-PAC  | Hexano/acetona (50:50 v/v)   | [20-30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ /NI]                        | (HO <i>et al</i> , 1981)           |
| NDELA           | Xampu, condicionadores, gel para banho, loção para o corpo, máscara facial, produtos para banho | GC-TEA           | OV 275 6% em Chromosorb WHP 80-100 mesh (120 cm x 2,2 mm d.i.)   | Hélio  | [1-3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ /NI]                          | (SPIEGELHALDER & PREUSSMANN, 1984) |
| NDELA           | Cremes e xampu  | GC-TEA           | OV 17 em Chromosorb W AW DMCS 60-80 mesh   | Nitrogênio   | [30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ]                              | (KIJIMA <i>et al</i> , 1985)       |
| NDELA           | Ingredientes cosméticos   | HPLC-TEA         | Waters $\mu$ Bondapak CN (300 mm x 4 mm, 5 $\mu\text{m}$ ) Spherisorb CN (250 mm x 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ ) e Spherisorb Silica (250 mm x 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ ) | Isooctano/cloreto de metileno/ metanol (75:19:6 v/v/v)   | 50-1000 $\text{ng g}^{-1}$ [50 $\text{ng g}^{-1}$ /NI]   | (ERICKSON <i>et al</i> , 1985)     |
| NDELA e NMPABAO | Creme e loção para pele   | HPLC-TEA e LC-MS | C8 (250 mm x 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ )   | Metanol/ acetato de amônio   | 6 – 200 $\text{ng NDELA}$ [5 $\text{ng/NI}$ ] NDELA      | (BILLEDEAU <i>et al</i> , 1994)    |
| NDELA           | Removedor de maquiagem, loção para o corpo, creme para as mãos e batom                          | CEC-UV           | C18 capilar modificado (50 $\mu\text{m}$ d.i.)   | 0,3 $\text{mol L}^{-1}$ ácido acético + 0,3 $\text{mol L}^{-1}$ ácido $\gamma$ -aminobutirico, pH 4,41 | 5 – 120 ppm [NI/1 ppm]                                   | (MATYSKA <i>et al</i> , 2000)      |

Tabela I.4.- (Continuação)

| Analito                           | Matriz   | Técnica                               | Fase estacionária  | Fase móvel   | Faixa linear [LOD/LOQ]  | Referência                        |
|-----------------------------------|--|---------------------------------------|--|--|---|-----------------------------------|
| NDELA                             | Produtos de higiene e cosméticos                 | GC-TEA                                | Carbowax amina (30 m x 0,53 mm, 1 µm espessura do filme) | Hélio  | NI<br>[3,5 µg kg <sup>-1</sup> /5,3 µg kg <sup>-1</sup> ]                               | (SCHOTHORST & STEPHANT, 2001)     |
| NDELA                             | Xampu, espuma e gel para banho, sabonete líquido | LC-MS/MS                              | Spherisorb ODS II (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)                | 2 mmol L <sup>-1</sup> acetato de amônio/ metanol                      | 0-1600 µg kg <sup>-1</sup><br>[22,8 µg kg <sup>-1</sup> /45,8 µg kg <sup>-1</sup> ]     | (SCHOTHORST & SOMERS, 2005)       |
| NDELA, NBHPA, NDMA, NDPLA, NDPHLA | Xampu, espuma para banho e creme para pele       | HPLC-DAD                              | Phenomenex Luna CN (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)               | Metanol, 1 mmol L <sup>-1</sup> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 4 | 0,2-100 mg L <sup>-1</sup><br>[0,02 mg L <sup>-1</sup> / 04-0,6 µg]                     | (WANG <i>et al</i> , 2006)        |
| NDELA                             | Produtos de higiene                              | HPLC-UV<br>(derivatização pós-coluna) | Spherisorb ODS II (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)                | 0,02 mmol L <sup>-1</sup> acetato de amônio pH 6,8                     | 1-20 ng mL <sup>-1</sup><br>[-/10-40 µg kg <sup>-1</sup> ]                              | (FLOWER <i>et al</i> , 2006)      |
| NDELA                             | Xampu, sabonete líquido                          | HPLC-UV                               | Eurospher-100 C18 column (250 mm x 4,6 mm, 5 µm),        | Água/acetonitrila  | 0,03-10000 µg mL <sup>-1</sup><br>[0,01 µg mL <sup>-1</sup> /0,03 µg mL <sup>-1</sup> ] | (GHASSEMPOUR <i>et al</i> , 2008) |

**N-nitrosaminas:** NDELA (N-nitrosodietanolamina), NDMA (n-nitrosodimetilamina), NMOR (N-nitrosomorfolina), NBHPA (N-nitroso-bis-(2-hidroxipropil) amina, NDPLA (N-nitrosodi-n-propilamina), NDPHLA (N-nitrosodifenilamina), NMPABAO (N-nitrosometil-*p*-amino-2-etilexilbenzoato). LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação.

**Outras abreviações:** TEA (*Thermal Energy Analyzer*), UV (ultra-violeta), DAD (detector de arranjo de diodos), CEC (eletrocromatografia capilar), GC-ECD (cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons), MS (espectrometria de massa), HPLC-TEA (cromatografia líquida de alta eficiência com detector de quimiluminescência) e LC-MS (cromatografia líquida associada a espectrometria de massas); LC-MS/MS (cromatografia líquida associada a espectrometria de massas *em tandem*); NI: não informado.

### **I.7.2 - Métodos Eletroquímicos – Eletrodo de diamante**

O carbono elementar se apresenta na natureza em duas formas mais conhecidas: grafite e diamante. No entanto, esses dois materiais apresentam características completamente diferentes. O grafite se apresenta como um material mole, de pouco brilho metálico e ótimo condutor, por outro lado o diamante apresenta alta dureza e caráter isolante.

Eletrodos tradicionais como carbono vítreo, fibra de carbono, nanotubo de carbono e grafite são amplamente utilizados em eletroquímica devido ao seu baixo custo, facilidade de preparação e possibilidade de se obter grande área superficial. Apesar dessas vantagens esses tradicionais eletrodos apresentam alguns inconvenientes, por exemplo, perda de estabilidade e necessidade de freqüente polimento ou descarte após breve uso.

A eletroquímica do diamante foi explorada pela primeira vez em 1983 quando cientistas japoneses do Instituto de Pesquisas Físicas e Químicas em Saitama reportaram o uso de um eletrodo de diamante com íons implantados (IWAKI *et. al.*, 1983). O resultado foi um eletrodo com ampla janela de potencial na região catódica e baixa corrente de fundo comparado ao carbono vítreo. No entanto, este diamante tinha se tornado condutor devido à implantação de Zn, o que resultou em danos em sua superfície.

Vários estudos foram conduzidos e, apenas em 1993, Swain e Ramesham reportaram o uso do diamante para aplicações analíticas (SWAIN & RAMESHAM, 1993) e Ramesham e colaboradores indicaram a vantagem do diamante no tratamento eletroquímico de efluentes (RAMESHAM *et al.*, 1993). Logo em seguida, Miller e colaboradores (MILLER *et al.*, 1994) reportaram o uso de diamante dopado como eletrodo.

O eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) é uma alternativa aos eletrodos de carbono tradicionais, pois possui estabilidade química e dimensional superior, baixa corrente de fundo e uma ampla janela de potencial.

A ampla janela de potencial (-1,5 a 2,2 V vs Ag/AgCl) comparado ao carbono vítreo (-1,0 a +1,0 V vs Ag/AgCl) tem possibilitado a detecção de uma

ampla faixa de compostos nesta região e permitido a geração de oxidantes como radicais hidroxilas com altos rendimentos. Além disso, por ser quimicamente estável, o diamante pode ser utilizado em meios líquidos altamente agressivos (RAO *et al.*, 1999).

Devido às suas excelentes propriedades, tem aumentado o número de trabalhos que utilizam este material para determinação de diversos analitos (CHAILAPAKUL, 2004). Como por exemplo, para oxidação eletroquímica de p-aminofenol (RATIU *et al.*, 2010); sulfonamidas (SOUZA *et al.*, 2008); paracetamol e cafeína (LOURENÇÃO *et al.*, 2009) NADH (RAO *et al.*, 1999), 4-nitrofenol (PEDROSA *et al.*, 2003), pesticidas (RAO *et al.*, 2002) ácido benzóico (MONTILLA *et al.*, 2002), pentaclorofenol (CODOGNOTO *et al.*, 2003), sulfonamidas (RAO *et al.*, 2000), entre outros (BOUVRETTE *et al.*, 2006).

Ainda, este material tem sido utilizado para oxidação de diversos compostos em águas residuárias (BENSALAH & ABDEL-WAHAB, 2010; ANGLADA *et al.*, 2010; BENSALAH *et al.*, 2009; BRILLAS *et al.*, 2008 e XUEMIN *et al.*, 2006), para determinação da atividade de proteínas (CHIKU *et al.*, 2010) e apenas o pó do diamante dopado com boro como fase estacionária para aplicação em cromatografia líquida modulada eletroquimicamente (EMLC) (MUNA *et al.*, 2008).

Porém, poucos são os métodos eletroquímicos utilizados para a determinação de N-nitrosaminas. A maioria deles trata apenas do estudo mecanístico ou breve estudo sobre o comportamento eletroquímico destes compostos (HOLLECK & SCHINDLER, 1958; BORGHESANI *et al.*, 1971; KARGIN *et al.*, 1975; IVERSEN, 1971; JACOB *et al.*, 1982).

Entre as técnicas eletroanalíticas atualmente utilizadas, a voltametria de onda quadrada (*square wave voltammetry* – SWV) tem provado ter detectabilidade adequada para quantificação de moléculas orgânicas. Além disso, também permite extrair informações valiosas acerca das características envolvidas nos processos de transferência de carga.

Sendo assim, esses métodos surgiram como uma alternativa para os métodos tradicionais de análises, pois se tem a possibilidade de trabalhar com

pequenos volumes de analito e amostra, breves ou quase nenhum preparo de amostra aliado a pequenos valores de detecção e quantificação.

Porém, o grande desafio e muitas vezes dificuldade de se alcançar com esses métodos é a seletividade, visto que muitas vezes a resposta alcançada é para uma classe de compostos, ou seja, para um determinado grupo eletroativo em comum.

Neste sentido, a cromatografia líquida de alta eficiência, como técnica de separação, aliada à detecção eletroquímica surgem como uma forma de unir a seletividade que se pode obter com a técnica de separação e a detectabilidade com as técnicas eletroanalíticas.

Na literatura é possível encontrar trabalhos utilizando o eletrodo de diamante dopado com boro como detector amperométrico em análise em fluxo (YU *et al.*, 2009; PREECHAWORAPUM *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2007; CHUANUWATANAKUL *et al.*, 2008; CHAILAPAKUL *et al.*, 2000; XU, 1998; KAPPANG *et al.*, 1999; WITEK & SWAIN 2001; NOTSU *et al.*, 2002; WANGFUENGKANAGUL & CHAILAPAKUL, 2002; SIANGPROH *et al.*, 2003; GRANGER *et al.*, 1999) cromatografia líquida (MARTINS *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2010; PREECHAWORAPUM *et al.*, 2006; CHAILAPAKUL *et al.*, 2002; IVANDINI *et al.*, 2002; TERASHIMA *et al.*, 2002; TERASHIMA *et al.*, 2003) e eletroforese capilar para determinação de drogas antidepressivas (IVANDINI *et al.*, 2002), aminas aromáticas (SHIN *et al.*, 2004), homocisteína (CHAILAPAKUL *et al.*, 2002), clorofenóis (TERASHIMA *et al.*, 2002), ácido úrico (POPA *et al.*, 2000), purina e pirimidina (IVANDINI *et al.*, 2007), neurotransmissores (QUAISEROVÁ-MOCKO *et al.*, 2008), entre outros.

No entanto, não se têm relatos na literatura sobre a determinação de N-nitrosaminas utilizando-se eletrodo de diamante como detector amperométrico para HPLC. Tendo em vista o reduzido número de detetores para compostos N-nitrosos estes métodos eletroanalíticos são de grande interesse e surgem como uma alternativa para a determinação de N-nitrosaminas, principalmente por serem de baixo custo e possíveis de serem acoplados com técnicas de separação. Estes podem ser aplicados para N-nitrosaminas voláteis e não voláteis.

## I.8 - PREPARO DE AMOSTRAS

A determinação de contaminantes em nível de traços em cosméticos e produtos de higiene requer anterior à etapa de quantificação, elaborado preparo de amostra que envolve a extração do analito da matriz, eliminação de interferentes e concentração. Os procedimentos de preparo de amostra dependem não só do analito e da composição da matriz a ser analisada como: gel, creme, loções, óleos e emulsões; mas também da técnica analítica e do sistema de detecção utilizado para a quantificação. A maioria dos métodos descritos na literatura sobre o preparo de amostra de cosméticos foi direcionada para as N-nitrosaminas não voláteis NDELA e NMOR, uma vez que essas foram as N-nitrosaminas mais identificadas nessas matrizes. De modo geral, diferentes procedimentos são conjugados, especialmente a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE).

Os principais procedimentos de preparo de amostras cosméticas para quantificação de N-nitrosaminas, descritas na literatura, levam em consideração o estado físico (sólido ou líquido) e propriedades físico-químicas da amostra (solubilidade em meio aquoso). A extração das N-nitrosaminas tem sido realizada por procedimentos de extração líquido-líquido com diclorometano (MATYSKA *et al.*, 2000; LIN *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2010), éter de petróleo e acetato de etila (ROLLMANN *et al.*, 1981) ou extração em fase sólida, empregando sílica gel (WANG *et al.*, 2006; ROLLMANN *et al.*, 1981; KIJIMA *et al.*, 1985), Extrelut® (SCHOTHORST & STEPHANY, 2001) e octadecilsilano (SCHOTHORST & SOMERS, 2005; GHASSEMPOUR *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2010). Também têm sido empregada a separação em coluna de troca aniônica (SPIEGELHALDER & PREUSSMANN, 1984; KIJIMA *et al.*, 1985; FUKUDA *et al.*, 1981).

Para o procedimento de preparo de amostra, utilizando método de extração em fase sólida, geralmente são tomados de 1 a 3 g de amostra. Para tanto, têm sido empregados tanto cartuchos de fase normal como de fase reversa. Anterior à percolação da amostra na fase estacionária do cartucho, a amostra é solubilizada em um solvente apropriado, agitada e centrifugada. Quando são empregados cartuchos a base de sílica, a amostra é solubilizada geralmente em acetato de

etila. A etapa de lavagem e eluição é realizada com a passagem de 20 mL de uma mistura acetona/diclorometano (60:40 v/v). O eluato é concentrado sob fluxo de nitrogênio e ressuspenso na fase móvel antes da quantificação (WANG *et al.*, 2006).

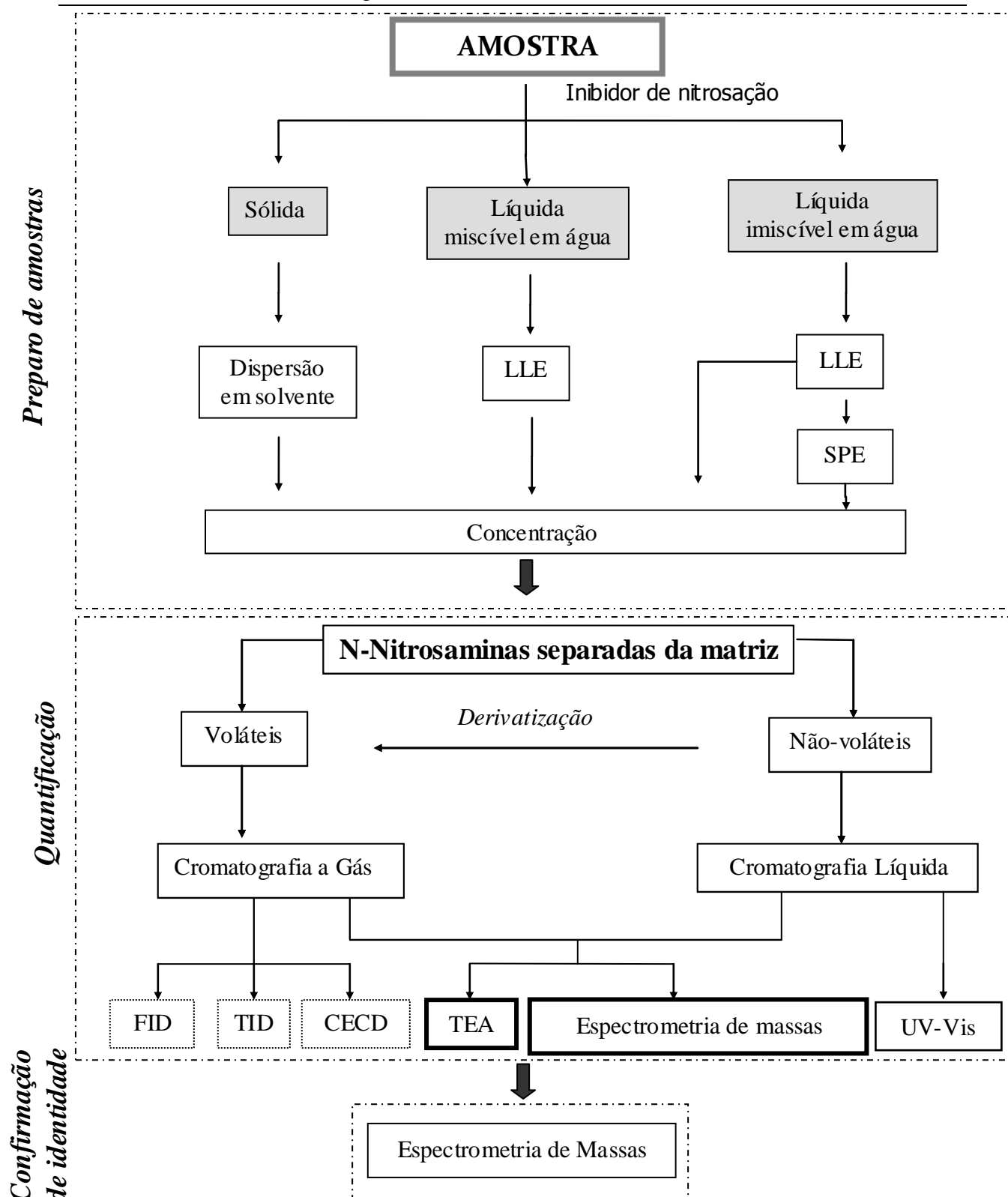
No caso do uso de cartuchos de fase reversa (octadecil) a amostra inicialmente é solubilizada em água e não são empregados solventes de lavagem para remoção de interferentes. Geralmente é descartada a fração inicial do volume aplicado, visando à eliminação de alguns compostos mais polares (SCHOTHORST & STEPHANY, 2001; FLOWER *et al.*, 2006; SCHOTHORST & SOMERS, 2005). A desvantagem do uso de cartuchos de fase reversa é que as N-nitrosaminas mais polares como a NDELA e NMOR não tem afinidade suficiente pela fase estacionária para permitir sua concentração durante a etapa de limpeza. Sendo assim, apenas são removidos da matriz os compostos mais apolares durante a extração em fase sólida.

Para quebrar emulsões e espuma tem sido empregados sais como o cloreto de sódio ou ultra-som (SCHOTHORST & STEPHANY, 2001; ERICKSON *et al.*, 1985).

Um ponto importante a ser considerado é a possível formação de artefatos (N-nitrosaminas) durante o preparo de amostras, o que deve ser inibido pela adição de ácido sulfâmico, ascorbato, hexiloxianilina ou outros inibidores de nitrosação anterior à etapa de preparo de amostras (SCHOTHORST & STEPHANY, 2001; BILLEDEAU *et al.*, 1994).

Um resumo do preparo de amostras e métodos de quantificação de N-nitrosaminas em cosméticos está apresentado na **Figura I.3**.





**Figura I.3** - Esquema apresentando os principais procedimentos de preparos de amostras de cosméticos e métodos de identificação e confirmação de identidade para N-nitrosaminas. LLE: extração líquido-líquido, SPE: extração em fase sólida, FID: detector de ionização por chama, TID: detector termoiônico, CECD: detector de condutividade eletrolítica de Coulson, TEA: detector de quimiluminescência, UV-Vis: detector de ultravioleta.



## **CAPÍTULO II**

### **Objetivos**



Os objetivos gerais deste trabalho foram:

- Avaliação do comportamento eletroquímico de N-nitrosaminas sob eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) e construção de um detector amperométrico para acoplamento em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando como eletrodo de trabalho diamante dopado com boro (DDB).
- Avaliação do detector eletroquímico desenvolvido e de outros sistemas de detecção para cromatografia líquida, como arranjo de fotodiodos (HPLC-DAD) e espectrometria de massas, visando à determinação de N-nitrosaminas em xampu.
- Validação de um método para a determinação de N-nitrosaminas em xampu e análise de amostras comercializadas no Brasil.



## **CAPÍTULO III**

**Estudo do comportamento eletroquímico de N-nitrosaminas sob eletrodo de diamante dopado com boro e confecção de um detector amperométrico para acoplamento a um cromatógrafo líquido de alta eficiência**





### III.1 - INTRODUÇÃO

O diamante é um material de difícil acessibilidade e por ser naturalmente isolante não fornecia os requisitos necessários para a fabricação de eletrodos. Assim, sua utilização em eletroquímica não despertava interesse. Porém, o desenvolvimento de novos métodos mais eficientes e relativamente mais baratos para a formação de filmes finos de diamante sintético a partir de reagentes gasosos, obtidos pela técnica de deposição química em fase-vapor ou CVD (*Chemical Vapor Deposition*) sob diferentes substratos, fez aumentar a procura por este material para fins eletroquímicos. O filme de diamante possui características de um semicondutor com boa condutividade ou filme quase metálico dependendo da concentração de dopante utilizada. A concentração do boro também determina a resistência específica do filme de diamante dopado com boro (DDB) (PLESKOV, 1999).

### III.2 - OBJETIVOS

O objetivo geral deste capítulo foi estudar o comportamento eletroquímico de N-nitrosaminas sob eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) e a confecção de uma célula amperométrica, utilizando o eletrodo de diamante como eletrodo de trabalho, para acoplamento em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-ED).

Os objetivos específicos compreenderam:

- (a) Estudo do comportamento eletroquímico das N-nitrosaminas no eletrodo de diamante dopado com boro;
- (b) Confecção de um detector eletroquímico utilizando como eletrodo de trabalho o eletrodo de diamante dopado com boro;
- (c) Construção do eletrodo de DDB para ser adaptado em uma célula amperométrica disponível comercialmente;
- (d) Desenvolvimento de método para a determinação de N-nitrosaminas em xampu usando HPLC-ED.

### **III.3 - MATERIAL E MÉTODOS**

#### **III.3.1 - Padrões Analíticos**

Os padrões analíticos de N-nitrosaminas (NA) (Sigma-Aldrich, EUA) utilizados neste trabalho foram: N-nitrosodietanolamina (NDELA) (99,99%), N-nitrosomorfolina (NMOR) (99,99%), N-nitrosodimetilamina (NDMA) (99,99%) e N-nitrosodietilamina (NDEA) (99,99%).

#### **III.3.2 - Reagentes e Soluções**

Todos os reagentes empregados neste trabalho foram de grau analítico e as soluções foram preparadas com água destilada e purificada em um sistema Milli-Q, modelo *Academic* (Millipore, EUA).

##### **III.3.2.1 - Solução de N-nitrosaminas**

As soluções estoque das N-nitrosaminas foram preparadas na concentração de  $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ , mediante diluição de volumes apropriados do padrão analítico em água.

##### **III.3.2.2 - Solução de fosfato de sódio ( $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ )**

A solução de fosfato de sódio  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada pela dissolução de 1,42 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  em balão de 100 mL, o pH foi ajustado com  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ou  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  na concentração de  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ . As soluções de fosfato de sódio  $0,010$  e  $0,050 \text{ mol L}^{-1}$  foram preparadas a partir da solução  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , mediante diluição com água.

### III.3.2.3 - Solução do par redox ( $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ )

A solução do par redox ( $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ ) na concentração de  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada pela dissolução de 0,080 g de  $K_3[Fe(CN)_6]$  e 0,100 g de  $K_4[Fe(CN)_6]$  em solução de  $H_2SO_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , utilizando-se balão volumétrico de 25 mL.

### III.3.3 – Equipamentos

Para os estudos eletroquímicos foi utilizado um potenciostato-galvanostato AUTOLAB® PGSTAT 30 (ECO CHEMIE) com sistema de 3 eletrodos:

- Eletrodo de trabalho: eletrodo de diamante: (área:  $25 \text{ mm}^2$ );
- Eletrodo de referência: Ag/AgCl, KCl  $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ;
- Eletrodo auxiliar: fio de platina.

A aquisição dos dados e o gerenciamento do potenciostato foram realizados por um microcomputador (Dell) e mediante programa computacional GPES.

Para ajuste do pH foi utilizado um pH-metro (Digimed DM-20, Brasil) e um eletrodo de vidro combinado também da Digimed – Instrumentação Analítica. O eletrodo de vidro combinado foi diariamente calibrado com tampões comerciais de pH 4,01 e 6,86.

Para os estudos utilizando HPLC com detecção eletroquímica foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência da Waters (EUA) composto por bomba binária modelo 1525 e um injetor da Rheodyne modelo 7725 com alça de amostragem de  $50 \mu\text{L}$ . Para gerenciamento do equipamento foi utilizado programa computacional Millennium<sup>32</sup> versão 4.0.

As colunas utilizadas foram: C18, XTerra™ (250 x 4,6 mm;  $5 \mu\text{m}$ ) e C18, XBridge™ (250 x 4,6 mm;  $5 \mu\text{m}$ ) , ambas da Waters.

### **III.3.3.1 - Eletrodo de diamante dopado com boro (DDB)**

O eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) utilizado neste trabalho foi preparado no *Centre Suisse d'Electronique et de Microtechnique SA (CSEM) Neuchâtel*, Suíça, utilizando como técnica deposição química a vapor por filamento aquecido (*Hot Filament Chemical Vapor Deposition* (HF-CVD)), com temperatura do filamento na faixa de 2440 a 2560 °C e mistura gasosa contendo metano, H<sub>2</sub> e trimetilboro, obtendo ao final do processo quantidade de boro da ordem de 8000 ppm. Esta placa de diamante foi fixada numa haste de cobre utilizando cola de prata e então a haste de cobre, bem como as arestas do DDB, foram isoladas com resina epóxi.

Este eletrodo foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Luis Alberto Avaca do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo.

### **III.3.3.2 - Célula eletroquímica utilizada para o estudo do comportamento eletroquímico das N-nitrosaminas**

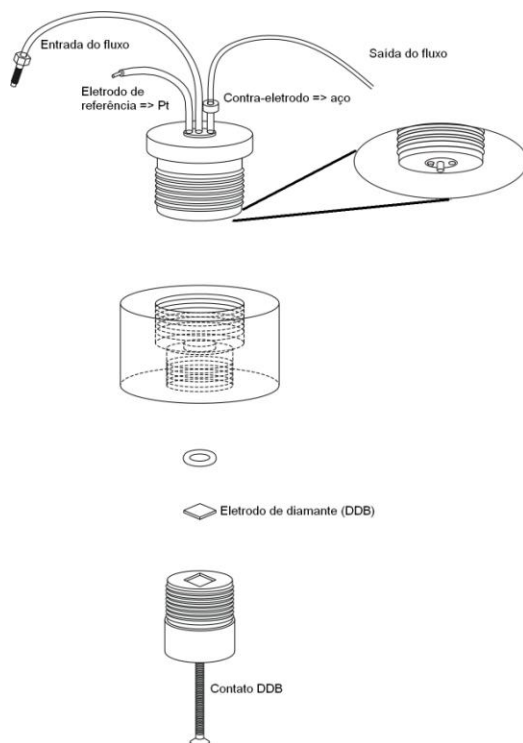
A célula eletroquímica utilizada era composta de um recipiente em vidro e tampa em Teflon<sup>®</sup> com compartimento para 3 eletrodos e adaptação para fluxo de nitrogênio.

A placa de diamante dopado com boro utilizada como eletrodo de trabalho apresentava uma área de 25 mm<sup>2</sup>. Como eletrodo de referência foi utilizado Ag/AgCl, KCl 3,0 mol L<sup>-1</sup> e como eletrodo auxiliar um fio de Pt.

### **III.3.3.3 - Célula eletroquímica confeccionada para detecção amperométrica associada ao sistema de cromatografia líquida**

A célula eletroquímica desenvolvida e utilizada para detecção amperométrica foi construída no laboratório em aço e Teflon<sup>®</sup> e está apresentada na **Figura III.1**. Os eletrodos utilizados foram: eletrodo de trabalho, DDB 8000 ppm

(área de 144 mm<sup>2</sup>); eletrodo de referência, fio de platina e eletrodo auxiliar, disco de aço de 133 mm<sup>2</sup>.



**Figura III.1** - Célula eletroquímica construída para detecção amperométrica, associada ao sistema de cromatografia líquida.

### III.3.4 - Procedimento Experimental

#### III.3.4.1 - Condicionamento do eletrodo de diamante dopado com boro

Para a realização dos experimentos, os eletrodos de DDB foram inicialmente submetidos a um tratamento anódico (polarização a +3,0 V vs Ag/AgCl, KCl 3 mol L<sup>-1</sup> por 10 min) para a remoção do filme hidrofóbico que recobria sua superfície. Após a retirada do filme hidrofóbico, o eletrodo foi submetido a uma nova polarização por 10 minutos com potencial de -3,0 V vs

Ag/AgCl, KCl 3 mol L<sup>-1</sup> (tratamento catódico), para a ativação e condicionamento da superfície. Adicionalmente, após o tratamento inicial, sempre que necessário para a recuperação da superfície eletródica, o eletrodo era submetido ao tratamento catódico (-3,0 V) por um tempo de 30 s.

### III.3.4.2 – Voltametria

Primeiramente foi realizado um estudo da influência do pH do meio (eletrólito fosfato de sódio) sobre a corrente e potencial de pico das N-nitrosaminas, utilizando-se a voltametria cíclica e como eletrodo de trabalho o eletrodo de diamante dopado com boro (DDB). As medidas foram efetuadas adicionando-se à célula eletroquímica 10 mL do eletrólito suporte, neste caso solução fosfato de sódio 0,10 mol L<sup>-1</sup> em pH variando de 3 a 8. Este estudo foi realizado separadamente para cada N-nitrosamina, sendo que em cada análise foram adicionados 400 µL de cada N-nitrosamina, na concentração de 0,86 10<sup>-2</sup>; 0,75 10<sup>-2</sup>; 1,36 10<sup>-2</sup> e 0,95 10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> de NMOR, NDELA, NDMA e NDEA, respectivamente, para cada pH estudado. Todas as soluções foram desaeradas sob fluxo de nitrogênio antes da análise. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos num intervalo de potencial de 1,0 a 2,2 V vs Ag/AgCl, KCl 3 mol L<sup>-1</sup>; com velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup>. Após escolha do melhor pH foi avaliado a influência da velocidade de varredura, sobre a corrente e potencial de pico, usando também a voltametria cíclica.

Na voltametria de onda quadrada foram avaliados os parâmetros como: frequência, no intervalo de 10 a 1000 s<sup>-1</sup>; amplitude, no intervalo de 10 a 100 mV e incremento de varredura, no intervalo de 1 a 10 mV. Definidos estes parâmetros foram construídas curvas analíticas para as N-nitrosaminas em estudo.

Para caracterização da célula eletroquímica foi utilizada solução do par redox (K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]) na concentração de 1,0 10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup>. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos num intervalo de potencial de -1,0 a 1,0 V com velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup>.

### **III.3.4.3 - Cromatografia líquida associada à detecção eletroquímica**

Para o sistema cromatográfico com detecção eletroquímica foi avaliada a concentração de fosfato de sódio ( $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $0,050 \text{ mol L}^{-1}$  e  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ) na fase móvel. Não foi usado modificador orgânico na fase móvel. Também, foram avaliadas as vazões da fase móvel de  $0,9$ ;  $1,0$ ;  $1,1$  e  $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ .

Ainda, foram avaliados diferentes potenciais  $1,7$ ;  $1,8$ ;  $1,9$ ;  $2,0$  e  $2,1 \text{ V vs Pt}$  afim de se obter a melhor resposta em termos de corrente. Para tanto, foi utilizada uma solução da mistura de N-nitrosaminas na concentração de  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , fase móvel  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH  $7,0$  e como fase estacionária foi utilizada uma coluna XBridge C18 ( $250 \times 4,6 \text{ mm}$ ;  $5 \mu\text{m}$ ). Foram construídas curvas analíticas, no solvente, para NDELA, NDMA e NMOR, utilizando como fase móvel fosfato de sódio  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH  $7,0$  e potencial aplicado de  $2,0 \text{ V}$ .

## **III.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A redução de N-nitrosaminas sobre diferentes materiais eletródicos tem sido amplamente discutida na literatura (HOLLECK & SCHINDLER 1958; BORGHESANI et al., 1971; KARGIN et al., 1975; IVERSEN, 1971; JACOB et al., 1982; FERNÁNDEZ-MARCOTE et al., 1998), principalmente empregando o eletrodo de mercúrio. A oxidação praticamente não tem sido explorada uma vez que essa ocorre em potenciais muito positivos e a maioria dos eletrodos sólidos não apresenta uma janela anódica tão grande, por exemplo, carbono vítreo com potencial de  $1,0 \text{ V vs SCE}$ . No entanto, o eletrodo de diamante em função de sua larga janela eletroquímica ( $-1,5$  a  $+2,2 \text{ V vs Ag/AgCl}$ ) possibilita avaliar o processo de oxidação das N-nitrosaminas e, portanto, esse foi selecionado neste estudo como eletrodo de trabalho. O pico de oxidação das N-nitrosaminas sobre o eletrodo DDB ocorre em potenciais próximos a  $1,9 \text{ V vs Ag/AgCl}$ ,  $\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$ .

Para estudar o comportamento eletroquímico das N-nitrosaminas no DDB foi utilizada a técnica de voltametria cíclica. Foram avaliados os seguintes parâmetros: pH do meio, composição do eletrólito suporte e velocidade de varredura. Na voltametria de onda quadrada (SWV) foi avaliada: frequência, amplitude e incremento de varredura.

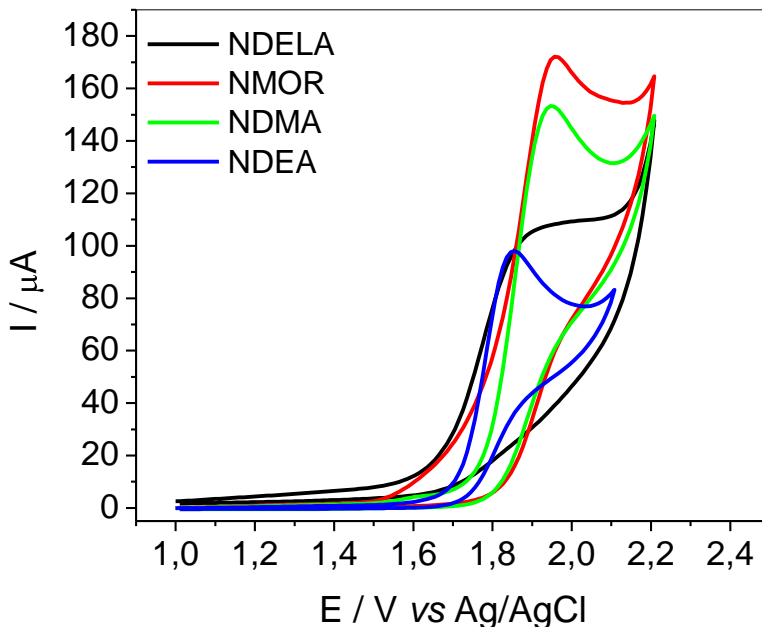
### **III.4.1 - Estudo do comportamento eletroquímico de N-nitrosaminas sobre o eletrodo de diamante dopado com boro**

#### **III.4.1.1 - Voltametria cíclica**

Foram testados como eletrólitos suporte: tampão Britton-Robinson (BR), composto de ácido acético, ácido bórico, ácido fosfórico e hidróxido de sódio; e fosfato de sódio, a fim de se avaliar a influência dos íons do eletrólito sobre a oxidação da NA no eletrodo de diamante. O eletrólito mais adequado, em termos de sinal analítico, para todas as N-nitrosaminas foi o fosfato de sódio na concentração de  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ . Em tampão BR as N-nitrosaminas não apresentam sinal no intervalo de potencial avaliado (1,0 a 2,2 V vs Ag/AgCl, KCl  $3 \text{ mol L}^{-1}$ ).

As N-nitrosaminas sob estudo em meio de fosfato de sódio sofrem oxidação em uma única etapa, com características de processo irreversível, uma vez que não existe pico na varredura reversa. Os valores de potenciais de pico próximos (em torno de 1,9 V) e perfil voltamétrico semelhante são indicativos de que a oxidação ocorre de forma similar para todas as N-nitrosaminas testadas e, provavelmente, refere-se ao grupo N-nitroso característico das N-nitrosaminas. Voltamogramas característicos para a NDELA, NMOR, NDMA e NDEA estão apresentados na **Figura III.2**.

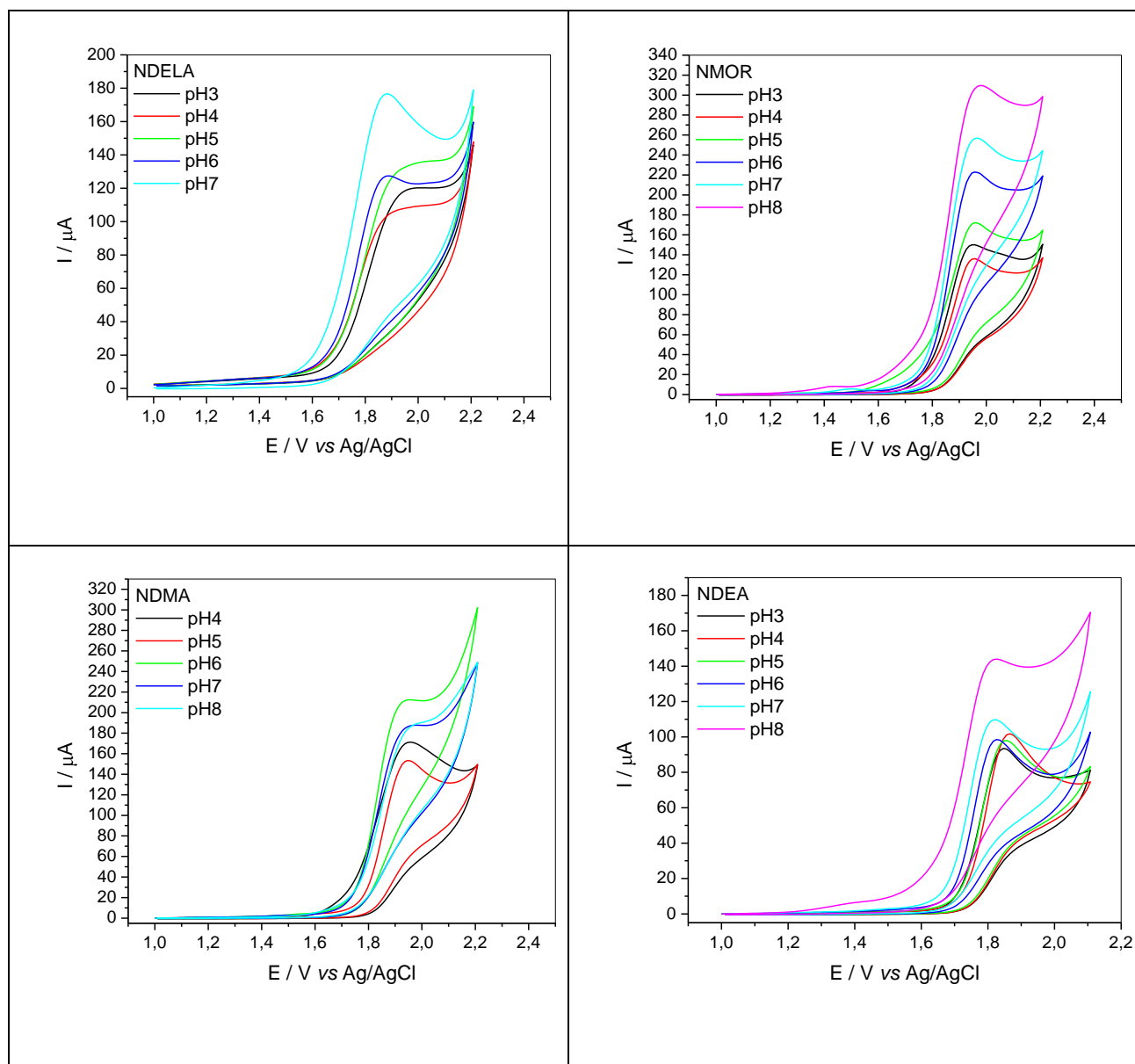




**Figura III.2** – Voltamogramas cíclicos obtidos para a NDELA, NMOR, NDMA e NDEA nas concentrações de  $3,0 \cdot 10^{-4}$ ;  $3,4 \cdot 10^{-4}$ ;  $5,4 \cdot 10^{-4}$  e  $3,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente, sobre o eletrodo de DDB em solução de fosfato de sódio  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 5,0 e velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .

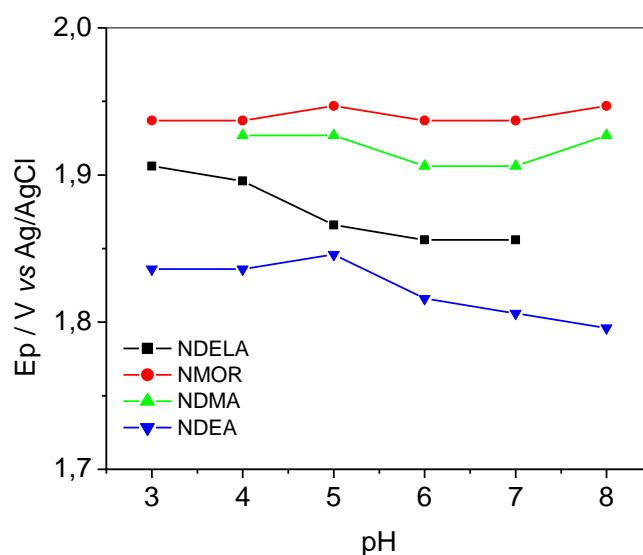
#### III.4.1.1.1 - Influência do pH

Os voltamogramas obtidos em diferentes valores de pH, no eletrólito suporte fosfato de sódio  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  para a NDELA, NMOR, NDMA e NDEA estão apresentados na **Figura III.3**. Não foi possível empregar o tampão BR para realizar o estudo do pH, uma vez que as N-nitrosaminas não apresentaram sinal neste tampão. O potencial de oxidação é muito elevado e o acetato (componente do tampão BR) interfere. Portanto, todos os estudos foram realizados no meio de fosfato de sódio, mesmo que o meio não tenha sido tamponado em toda a faixa de pH.



**Figura III.3** - Voltamogramas cíclicos da NDELA, NMOR, NDMA e NDEA obtidos para o estudo do pH em fosfato de sódio  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  com eletrodo de diamante dopado com boro. Concentração das N-nitrosaminas na célula eletroquímica:  $3,0 \cdot 10^{-4}$ ;  $3,4 \cdot 10^{-4}$ ;  $5,4 \cdot 10^{-4}$  e  $3,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  para NDELA, NMOR, NDMA e NDEA, respectivamente; velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

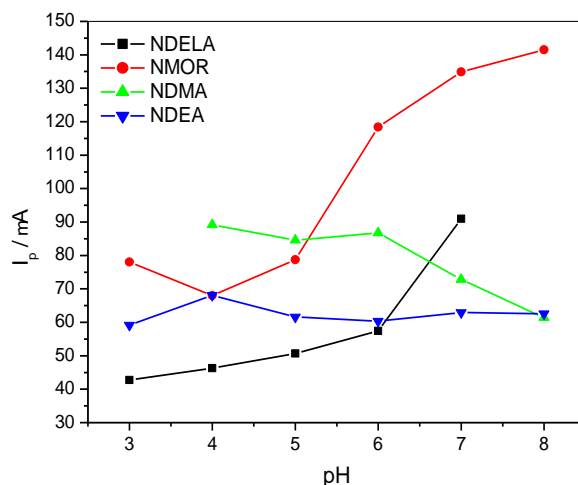
Pode-se observar (**Figura III.4**) que as mudanças que ocorrem no potencial de pico são pouco significativas para todas as NA avaliadas no fosfato de sódio no intervalo de pH de 3 a 8. Estes resultados são indicativos de que a reação de oxidação destas NA sobre o eletrodo de DDB não depende de protonação da molécula neste intervalo de pH. No entanto, pode se verificar que existe variação no potencial de pico entre as NA avaliadas. Entre as NA alifáticas, NDMA e NDEA, verifica-se que a NDEA apresenta um potencial de oxidação menor. Como a NDEA tem uma cadeia maior de carbonos ligado ao grupo nitroso, mais fácil será a retirada de elétrons (oxidação) e, portanto, menor será o potencial de pico. No caso da NDELA e NMOR os dois compostos têm átomos de oxigênio na estrutura, que são eletronegativos e dificultam, neste sentido, a oxidação do grupo nitroso.



**Figura III.4** - Variação do potencial de pico com o pH do meio para NDELA, NMOR, NDMA e NDEA, nas concentrações de  $3,0 \cdot 10^{-4}$ ;  $3,4 \cdot 10^{-4}$ ;  $5,4 \cdot 10^{-4}$  e  $3,8 \cdot 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente, em fosfato de sódio 0,10 mol L<sup>-1</sup>.

Na **Figura III.5** é apresentado o comportamento da corrente de pico em função do pH do fosfato de sódio 0,10 mol L<sup>-1</sup> para as N-nitrosaminas NDELA, NMOR, NDMA e NDEA. Pode ser observado que a corrente de pico não sofre

mudanças significativas para as NA alifáticas NDMA e NDEA com a variação do pH. Para a NDELA e a NMOR verifica-se um aumento de corrente de pico a partir de pH 5, o que indica que existe um equilíbrio ácido-base envolvido para essas duas NA, e que a espécie protonada é oxidada em menor proporção (corrente de pico de menor intensidade).



**Figura III.5** - Variação da corrente de pico com o pH do meio para NDELA, NMOR, NDMA e NDEA, nas concentrações de  $3,0 \cdot 10^{-4}$ ;  $3,4 \cdot 10^{-4}$ ;  $5,4 \cdot 10^{-4}$  e  $3,8 \cdot 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente, em fosfato de sódio 0,10 mol L<sup>-1</sup>.

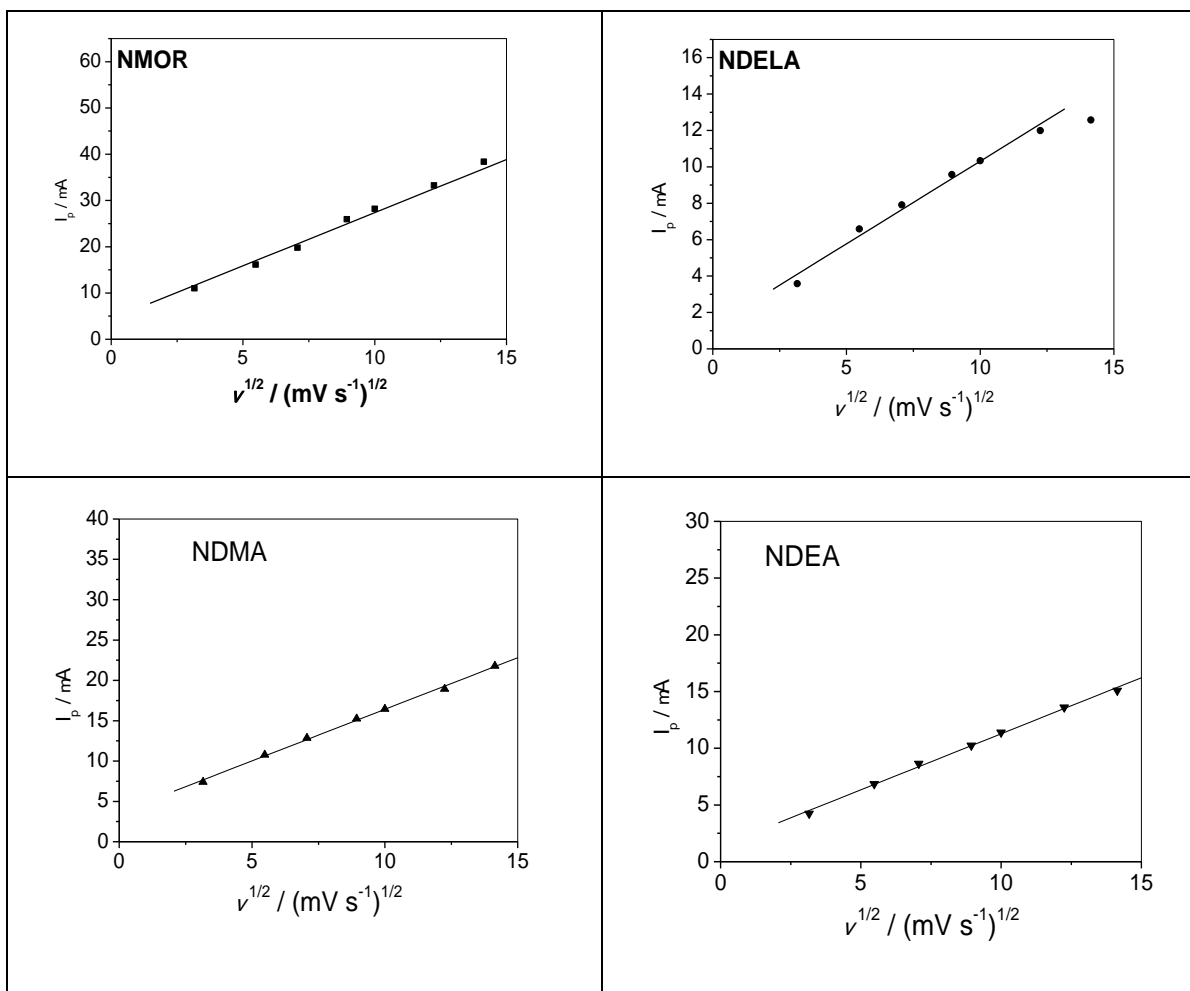
A princípio para os estudos subseqüentes foi selecionado o pH 5, embora neste meio não tenha sido obtido melhor sinal analítico para todas as NA. No entanto, neste pH uma pequena variação no mesmo não provocaria uma grande variação na resposta da maioria das NA, exceto para a NMOR. Futuramente, quando a célula amperométrica for acoplada ao HPLC, o efeito do pH teria que ser reavaliado, uma vez que seria necessário encontrar um compromisso entre separação das NA na coluna cromatográfica e detectabilidade (resposta do detector).

#### III.4.1.1.2 - Influência da velocidade de varredura

A velocidade de varredura é um parâmetro com o qual se pode obter informações acerca da reversibilidade do sistema, assim como avaliar se o

processo é controlado por difusão ou adsorção das espécies à superfície do eletrodo. De modo geral, processos de adsorção podem levar a passivação da superfície eletródica, o que seria uma desvantagem em sistemas em fluxo.

Foi verificado que a corrente de pico varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura para a NMOR, NDELA, NDMA e NDEA (**Figura III.6**), indicando que o processo é controlado pela difusão das espécies para a superfície eletródica (GOSSER, 1993).



**Figura III.6** - Variação da corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura para NMOR, NDELA, NDMA e NDEA, nas concentrações de  $0,86 \cdot 10^{-4}$ ;  $0,75 \cdot 10^{-4}$ ;  $1,36 \cdot 10^{-4}$  e  $0,95 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente, em fosfato de sódio  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  pH 5,0.

### III.4.1.2 - Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada (SWV) é uma das técnicas voltamétricas de pulso mais rápidas e sensíveis. Além disso, a análise dos parâmetros característicos desta técnica também possibilita a avaliação cinética e mecanística do processo eletródico. Neste trabalho, os principais parâmetros avaliados foram: frequência da onda quadrada ( $f$ ), amplitude do pulso da onda quadrada ( $a$ ) e incremento de varredura ( $\Delta E_s$ ). A avaliação e otimização destes parâmetros também são importantes para o estabelecimento do método para fins quantitativos.

Os voltamogramas obtidos para as NA em estudo apresentaram apenas um pico de oxidação com características irreversíveis, corroborando os resultados obtidos na voltametria cíclica.

#### III.4.1.2.1 - Variação da frequência de onda quadrada

A frequência ( $f$ ) é uma das mais importantes variáveis na voltametria de onda quadrada. A uma concentração constante é essa variável que determina a intensidade dos sinais e, conseqüentemente, a detectabilidade do método.

De acordo com OSTERYOUNG e O'DEA (1982), nos processos controlados por difusão a corrente de pico varia com a raiz quadrada da frequência, enquanto que para sistemas controlados por adsorção a corrente de pico varia linearmente com a frequência de aplicação dos pulsos. Os resultados obtidos para as NA estão de acordo com o observado no estudo da velocidade de varredura, por voltametria cíclica, onde a intensidade da corrente de pico varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura. A **Tabela III.1** apresenta a equação da reta e os coeficientes de regressão linear obtidos a partir do gráfico de intensidade de corrente em função da raiz quadrada da frequência.

**Tabela III.1** – Equação da reta e coeficiente de regressão linear obtido para o intervalo de frequência de 10 até 100 s<sup>-1</sup>

| Nitrosamina  | Equação   | r     |
|--------------|---|-------|
| <b>NMOR</b>  | $i_p(\mu A) = 1,08 \cdot 10^{-5} + 5,97 \cdot 10^{-6} (s^{-1/2})$ | 0,990 |
| <b>NDELA</b> | $i_p(\mu A) = 1,93 \cdot 10^{-5} + 1,45 \cdot 10^{-6} (s^{-1/2})$ | 0,989 |
| <b>NDMA</b>  | $i_p(\mu A) = 2,51 \cdot 10^{-5} + 2,39 \cdot 10^{-6} (s^{-1/2})$ | 0,990 |
| <b>NDEA</b>  | $i_p(\mu A) = 1,29 \cdot 10^{-5} + 3,14 \cdot 10^{-6} (s^{-1/2})$ | 0,997 |

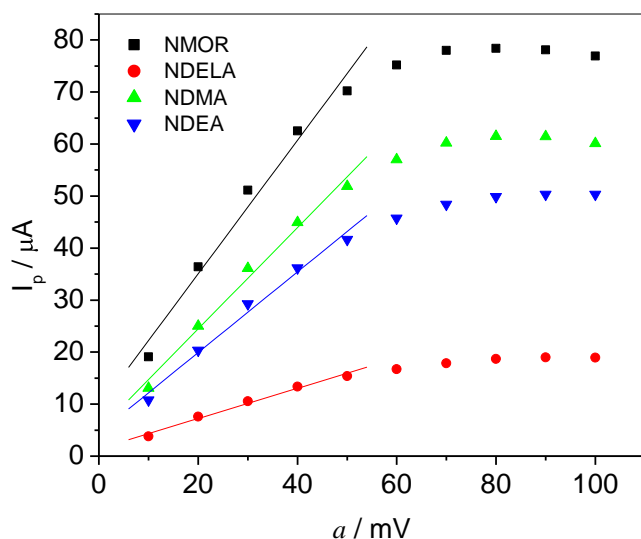
$i_p$ : intensidade da corrente de pico.

#### III.4.1.2.2 - Variação da amplitude da onda quadrada

Uma forma de melhorar a detectabilidade na voltametria de onda quadrada para processos redox totalmente irreversíveis é aumentar a amplitude de aplicação dos pulsos de potenciais (a).

Foi verificado que a corrente de pico aumenta em função do aumento da amplitude do pulso, tendo uma relação linear até 50 mV (**Figura III.7**). Para amplitudes maiores que 50 mV não houve aumento significativo da corrente. Estes resultados estão de acordo com os preditos pela teoria da voltametria de onda quadrada, aplicada a sistemas irreversíveis, que afirma que para amplitudes acima de 50 mV a corrente de pico é praticamente constante (SOUZA *et al.*, 2003).

Para os estudos subsequentes foi empregada uma amplitude de pulso de 50 mV.



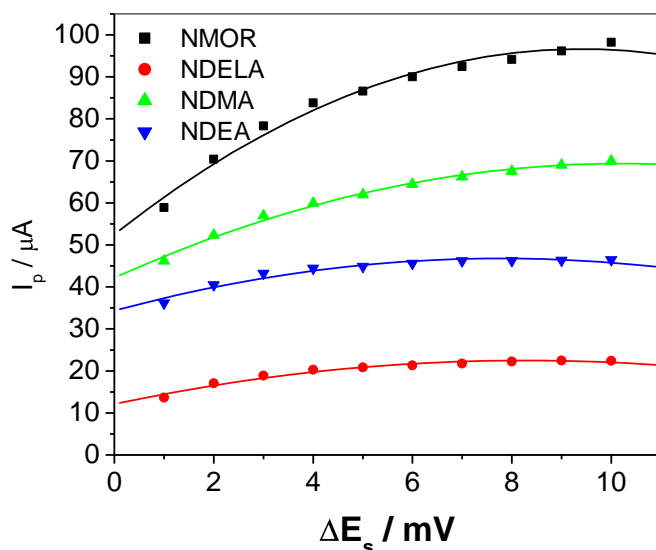
**Figura III.7** - Variação da amplitude da onda quadrada sobre as correntes de pico para NMOR, NDELA, NDMA e NDEA, nas concentrações de  $0,86 \cdot 10^{-4}$ ;  $0,75 \cdot 10^{-4}$ ;  $1,36 \cdot 10^{-4}$  e  $0,95 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente. Eletrólito suporte: fosfato de sódio  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 5,0;  $\Delta E_s$ :  $2 \text{ mV}$ ,  $f$ :  $100 \text{ s}^{-1}$ .

#### III.4.1.2.3 - Variação do incremento de varredura

A velocidade efetiva na voltametria de onda quadrada é o resultado do produto da frequência pelo incremento de varredura. Deste modo, um incremento de varredura maior pode aumentar o sinal obtido e, assim, melhorar a detectabilidade do método. No entanto, com incrementos maiores podem ocorrer alargamentos nos picos obtidos e, como consequência, a resolução dos picos no voltamograma pode ficar comprometida. Sendo assim, o incremento de varredura é um parâmetro que merece ser avaliado.

Na **Figura III.8** é apresentada a dependência do potencial de pico e da intensidade da corrente de pico em função da variação do incremento de varredura para a NMOR, NDELA, NDMA e NDEA.





**Figura III.8** - Variação do incremento de varredura sobre as correntes de pico de onda quadrada para NMOR, NDELA, NDMA e NDEA, nas concentrações de  $0,86 \cdot 10^{-4}$ ;  $0,75 \cdot 10^{-4}$ ;  $1,36 \cdot 10^{-4}$  e  $0,95 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  respectivamente. Eletrólito suporte: fosfato de sódio  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 5,0;  $a$ :  $50 \text{ mV}$  e  $f$ :  $100 \text{ s}^{-1}$ .

Pode-se observar que a intensidade de corrente de pico aumenta com o aumento de  $\Delta E_s$ . Apesar de incrementos maiores melhorarem a detectabilidade na análise, estes apresentaram deslocamento do potencial de pico. Por esse motivo optou-se por trabalhar com incremento igual a  $2 \text{ mV}$ .

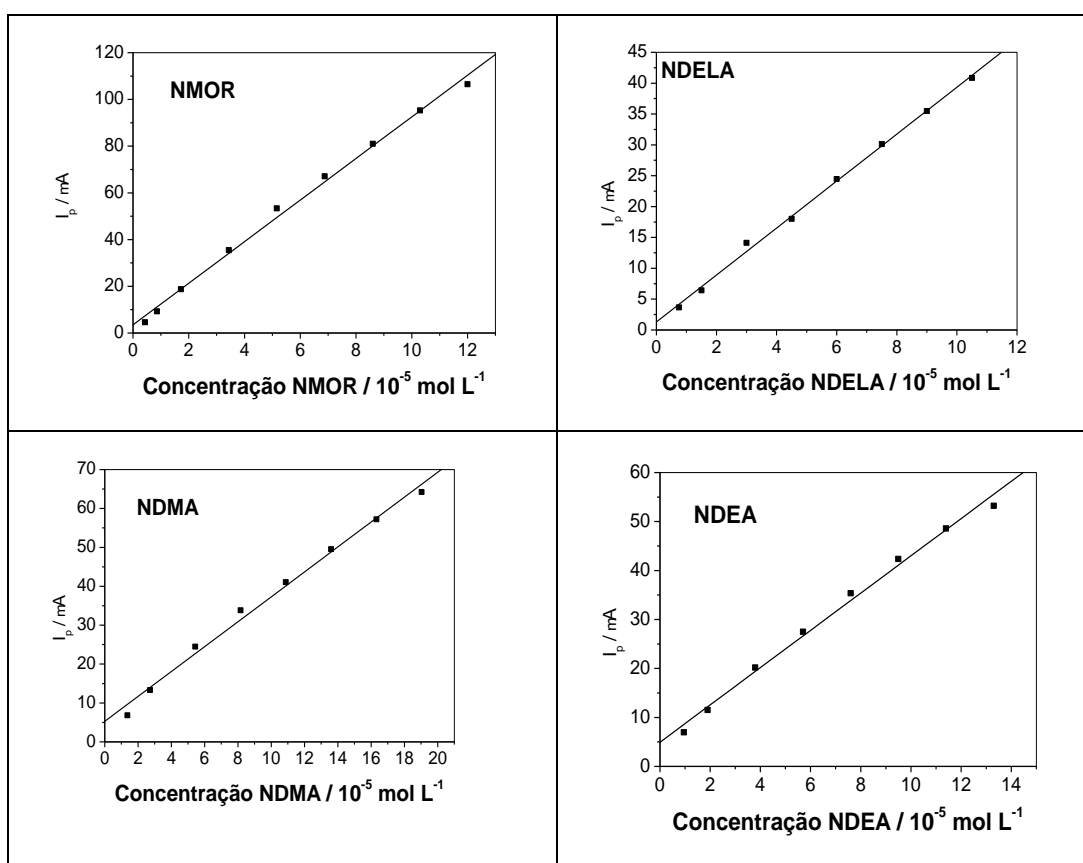
Considerando que todas as NA apresentam um comportamento eletroquímico semelhante, com a oxidação irreversível, processo controlado pela difusão das espécies e reações próton independentes, podemos sugerir que o processo redox ocorre no grupo nitroso da molécula, conforme reação (Reação III.1) a seguir. Esses resultados estão de acordo com o reportado na literatura (OLIVEIRA *et al.*, 2008).



**Reação III.1** – Mecanismo de oxidação das NA sob eletrodo de diamante.

### III.4.1.3 - Dependência da corrente de pico em função da concentração

Depois de otimizados todos os parâmetros para a voltametria de onda quadrada, foram construídas as curvas analíticas no intervalo de concentração de  $4,3 \cdot 10^{-6}$  a  $12,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  para NMOR;  $7,5 \cdot 10^{-6}$  a  $10,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  para NDELA;  $1,36 \cdot 10^{-5}$  a  $1,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  para NDMA e  $9,5 \cdot 10^{-6}$  a  $13,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  para NDEA. As condições empregadas para a SWV foram:  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ;  $a = 50 \text{ mV}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ . As curvas analíticas estão apresentadas na **Figura III.9**.



**Figura III.9** – Curvas analíticas obtidas para NMOR, NDELA, NDMA e NDEA por SWV usando eletrodo DDB. Os parâmetros utilizados foram:  $f = 100 \text{ s}^{-1}$ ;  $a = 50 \text{ mV}$ ;  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$  e eletrólito suporte fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  pH 5,0.

Os valores das figuras de mérito: faixa linear, linearidade, sensibilidade e detectabilidade estão apresentados na **Tabela III.2**. A linearidade é expressa pelo coeficiente de correlação linear e a sensibilidade é o coeficiente angular da curva.

**Tabela III.2** – Parâmetros obtidos das curvas analíticas para as N-nitrosaminas utilizando voltametria de onda quadrada

| Parâmetros                                | NMOR      | NDELA     | NDMA       | NDEA      |
|---|-----------|-----------|------------|-----------|
| Faixa Linear<br>$\mu\text{mol L}^{-1}$    | 4,3 a 120 | 7,5 a 105 | 13,6 a 190 | 9,5 a 133 |
| Linearidade                               | 0,997     | 0,998     | 0,996      | 0,996     |
| Sensibilidade<br>$\mu\text{A/mol L}^{-1}$ | 0,890     | 0,380     | 0,320      | 0,380     |

(\*) Na célula voltamétrica.

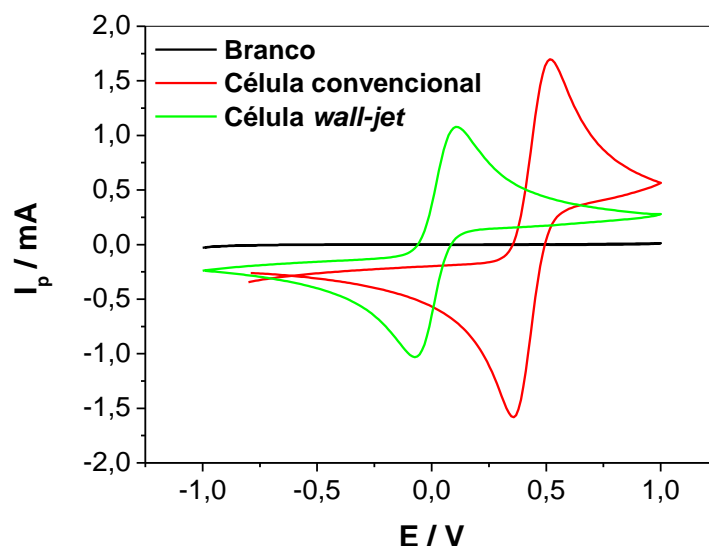
A partir dos resultados obtidos verifica-se que a maior sensibilidade foi obtida para a NMOR, o que corrobora os resultados obtidos anteriormente no estudo do pH do meio, no qual a NMOR apresentou uma maior intensidade de pico em pH 5. As demais NA apresentam praticamente a mesma sensibilidade neste pH. Em todo o intervalo de concentração avaliado, as curvas se mostraram com uma linearidade adequada ( $r > 0,99$ ).

Os resultados obtidos evidenciam que seria possível o desenvolvimento de método para a determinação de nitrosaminas totais, usando a voltametria de onda quadrada.

### III.4.2 – Confeção e avaliação do detector eletroquímico *wall-jet* utilizando como eletrodo de trabalho diamante dopado com boro

#### III.4.2.1 – Confeção e caracterização da célula eletroquímica

A célula eletroquímica foi confeccionada em Teflon<sup>®</sup> e aço inoxidável, conforme apresentado na **Figura III.1**. Como eletrodo de trabalho foi usado o DDB (144 mm<sup>2</sup>) e como pseudo eletrodo de referência um fio de platina. Como contra eletrodo foi usado o próprio aço da célula. No início foi avaliado o uso do Ag/AgCl como eletrodo de referência, mas esse não se mostrou vantajoso operacionalmente para a célula em fluxo, uma vez que a solução interna do eletrodo (KCl) tinha que ter um compartimento separado. O uso da platina como pseudo-referência apresentou vantagens uma vez que dispensaria esse reservatório. Como o eletrodo de referência foi modificado, foi necessário a caracterização da célula, o que foi feito usando a sonda eletroquímica (K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]) e a técnica de voltametria cíclica. Além disso, também seria importante avaliar a queda ôhmica. A célula *wall-jet* foi comparada com uma célula convencional que faz uso de um eletrodo de Ag/AgCl, KCl 3 mol L<sup>-1</sup> como referência. A **Figura III.10** mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para as duas células.



**Figura III.10** - Voltamogramas cíclicos característicos para o par redox ( $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ ) na concentração de  $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  em solução de  $H_2SO_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , utilizando a célula *wall-jet* construída com eletrodo de referência platina e célula convencional com eletrodo de referência Ag/AgCl, KCl  $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ . Eletrodo de trabalho: diamante dopado com boro.

Os parâmetros obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos são apresentados na **Tabela III.3**. Observa-se uma mudança do potencial de pico para o par redox para valores mais catódicos com a célula *wall-jet*, o que é justificado pela mudança do eletrodo de referência de Ag/AgCl para Pt. No entanto, não foi observada uma variação significativa no  $\Delta E_p$ , indicando que não há uma resistência maior na célula em fluxo do que na célula convencional, ou seja, os eletrodos estão devidamente posicionados.

**Tabela III.3** – Parâmetros obtidos dos voltamogramas cíclicos característicos para o par redox ( $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ ), utilizando a célula *wall-jet* e a célula convencional

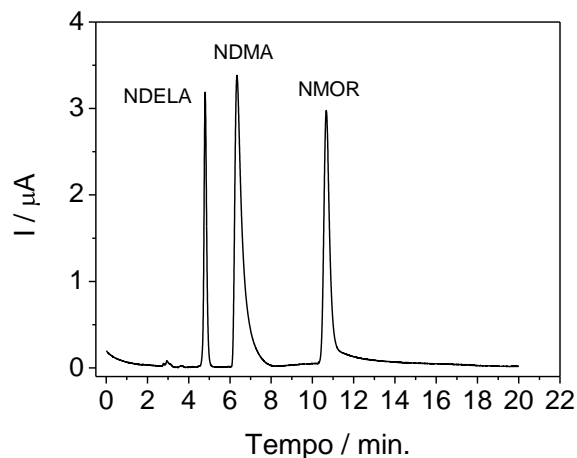
| Célula          | $E_{pc}$ (V) | $E_{pa}$ (V) | $I_{pc}$ ( $\mu A$ ) | $I_{pa}$ ( $\mu A$ ) | $\Delta E_p$ (V) | $E^{o'}$ (V) |
|-----------------|--------------|--------------|----------------------|----------------------|------------------|--------------|
| Convencional    | 0,352        | 0,517        | -1,3673              | 1,5531               | 0,165            | 0,4345       |
| <i>Wall-jet</i> | -0,069       | 0,106        | -0,9355              | 1,0741               | 0,175            | 0,0185       |

$E_{pc}$  e  $E_{pa}$  = potencial de pico catódico e anódico, respectivamente.  $I_{pc}$  e  $I_{pa}$  = corrente de pico catódico e anódico, respectivamente.  $\Delta E_p$  = diferença de potencial entre os picos catódicos e anódicos.  $E^{o'}$  = potencial formal.

#### III.4.2.2 - Avaliação da célula *wall-jet* associada ao HPLC

Após feita a caracterização da célula eletroquímica, a mesma foi acoplada ao HPLC. Inicialmente foram avaliados parâmetros como potencial aplicado e vazão da fase móvel. Para tanto, foi empregada uma coluna octadecil híbrida C18, XBridge™ 250 x 4,6 mm; 5  $\mu m$  (Waters, EUA) a qual apresentou melhor separação para essas N-nitrosaminas, (estudo de otimização das melhores condições de separação estão apresentadas no capítulo IV). A separação das NA foi realizada em uma condição isocrática, com fase móvel composta por fosfato de sódio 0,10 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0. Embora para os estudos do comportamento eletroquímico tenha sido escolhido o pH 5,0; pois nesse pH todas as NA apresentavam corrente de pico próximas, para os estudos utilizando a detecção amperométrica optou-se por escolher um pH onde a maioria das NA tivessem o máximo de corrente e que fosse possível uma separação com resolução adequada na coluna cromatográfica para todas as NA. Os potenciais avaliados foram 1,7; 1,8; 1,9; 2,0 e 2,1 V vs Pt, sendo que o melhor compromisso entre intensidade de corrente obtida e ruído na linha de base foi com o potencial de 2,0 V. Fixado o melhor potencial para detecção eletroquímica foi avaliado a vazão da fase móvel (0,9; 1,0; 1,1 e 1,2 mL min<sup>-1</sup>) a fim de se obter corridas num menor

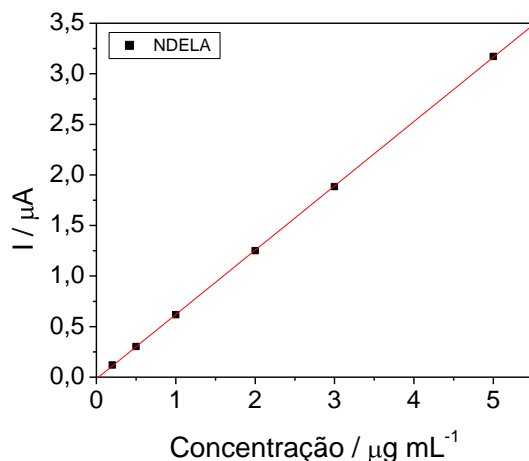
intervalo de tempo, sem no entanto comprometer a eficiência da separação. Os melhores resultados foram obtidos com uma vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ . Desse modo o potencial aplicado no detetor amperométrico foi de  $2,0 \text{ V}$  e a vazão da fase móvel foi de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ . A **Figura III.11** apresenta um cromatograma característico da separação da NDELA, NDMA e NMOR com detecção eletroquímica sob eletrodo DDB.



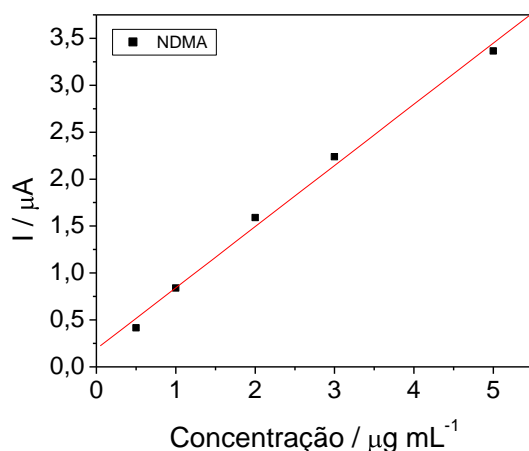
**Figura III.11** – Cromatograma característico obtido para NDELA, NDMA e NMOR na concentração de  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , utilizando a célula *wall-jet*. Fase móvel: fosfato de sódio  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0; com vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  e volume de injeção de  $50 \mu\text{L}$ . Coluna XBridge™. Potencial:  $2,0 \text{ V vs. Pt}$ .

#### III.4.2.2.1 – Curva analítica

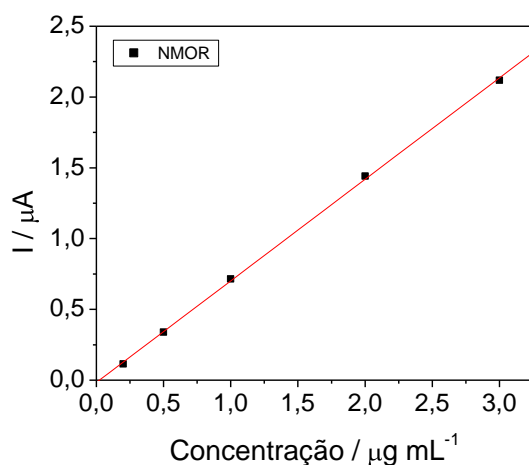
Após a otimização das melhores condições para detecção eletroquímica foram construídas curvas analíticas, no solvente, para essas NA (**Figura III.12**, **III.13** e **III.14**). Os parâmetros estabelecidos a partir das curvas estão apresentadas na **Tabela III.4**.



**Figura III.12** - Curva analítica para N-nitrosodietanolamina no intervalo de 0,2 a 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  utilizando detecção eletroquímica. Fase móvel: fosfato de sódio 0,10  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 7,0; com vazão de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$  e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . Potencial: 2,0 V vs Pt.



**Figura III.13** - Curva analítica para N-nitrosodimetilamina no intervalo de 0,5 a 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  utilizando detecção eletroquímica. Fase móvel: fosfato de sódio 0,10  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 7,0; com vazão de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$  e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . Potencial: 2,0 V vs Pt.



**Figura III.14** - Curva analítica para N-nitrosomorfolina no intervalo de 0,2 a 3,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  utilizando detecção eletroquímica. Fase móvel: fosfato de sódio 0,10  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 7,0; com vazão de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$  e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . Potencial: 2,0 V vs Pt.



**Tabela III.4** – Parâmetros obtidos das curvas analíticas para as N-nitrosaminas utilizando HPLC-ED

| Parâmetros  | NDELA     | NDMA      | NMOR      |
|---|-----------|-----------|-----------|
| <b>Faixa Linear (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>            | 0,2 a 5,0 | 0,7 a 5,0 | 0,2 a 3,0 |
| <b>Linearidade</b>  | 0,9999    | 0,9967    | 0,9998    |
| <b>Sensibilidade <math>\mu\text{A}/\mu\text{g mL}^{-1}</math></b> | 0,63      | 0,65      | 0,72      |
| <b>LDI* (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>                    | 0,05      | 0,2       | 0,05      |

(\*) LDI: limite de detecção do instrumento.

O limite de detecção do instrumento foi estimado pela razão sinal-ruído igual a 3 e representa a menor concentração de N-nitrosamina que o equipamento consegue detectar.

As curvas apresentaram linearidade adequada ( $r > 0,99$ ) no intervalo estudado e como já observado anteriormente a NMOR apresentou uma sensibilidade maior do que a NDELA e NDMA.

Os resultados obtidos demonstram a viabilidade da nova célula eletroquímica construída utilizando eletrodo de Pt como referência e do eletrodo de DDB como eletrodo de trabalho acoplado a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de N-nitrosaminas.

### III.5 - CONCLUSÕES

- As N-nitrosaminas NDMA, NDEA, NDELA e NMOR são eletroativas no eletrodo de diamante dopado com boro, apresentando um pico anódico irreversível em aproximadamente 1,8 V.
- A reação de oxidação destas N-nitrosaminas sobre o eletrodo de DDB não depende de protonação no intervalo de pH de 3 a 8.
- A célula eletroquímica construída usando como eletrodo de trabalho o DDB e referência e auxiliar, Pt e aço, respectivamente, mostrou-se adequado para ser associado ao cromatógrafo a líquido de alta eficiência.
- O detector eletroquímico pode ser utilizado seqüencialmente com outro detector cromatográfico, assim como em outras aplicações analíticas.

- O detetor eletroquímico com eletrodo DDB possibilita a determinação tanto de N-nitrosaminas não voláteis como voláteis, permitindo o estabelecimento de métodos analíticos de aplicação geral para a determinação destes compostos.

## **CAPÍTULO IV**

**Determinação de N-nitrosaminas em xampu por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a diversos tipos de detectores**



## IV.1 - INTRODUÇÃO

Neste trabalho foram avaliados vários sistemas de detecção associados à cromatografia líquida: arranjo de fotodiodos (DAD), eletroquímico (ED), utilizando a célula amperométrica do tipo *wall-jet* desenvolvida e já apresentada no capítulo III e a célula amperométrica do tipo *thin-layer*, espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS) e espectrometria de massas (MS). Tendo em vista que a seletividade do método é uma função do sistema de detecção utilizado, diferentes preparos de amostras foram avaliados.

Em princípio, a técnica de espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS), usando um espectrômetro híbrido (Q ToF), foi introduzida no presente trabalho apenas com o objetivo de confirmação de identidade das N-nitrosaminas nas amostras, complementando o método analítico a ser desenvolvido para quantificação desses analitos por HPLC-ED.

A grande maioria dos métodos analíticos publicados, envolvendo LC-MS/MS na determinação de resíduos em matrizes complexas, emprega o analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (QqQ). No entanto, a habilidade do analisador de massas do tipo tempo de voo (ToF, do inglês - *Time of Flight*) prover resultados de alta qualidade devido à medição de massas exatas dos analitos, o torna um instrumento de grande interesse para compor métodos confirmatórios de análise dentro do contexto legislativo, como o da Comunidade Europeia (EC, 2002). Os equipamentos de MS empregados no presente estudo foram: LC-MS/MS composto por um sistema híbrido de analisadores de massas em série: o quadrupolo e o ToF (Q ToF) e um LC-MS composto por um analisador quadrupolo.

É importante ressaltar que devido ao caráter seletivo, em específica faixa de massa (modo MRM, do inglês, Multiple Reaction Monitoring e SIR, Single Ion Monitoring), e de alta resolução oferecido pela técnica de espectrometria de massas, em especial quando se envolve um analisador do tipo ToF, a qualidade da separação cromatográfica é menos crítica quando associada a esta técnica,

frente a um sistema cromatográfico associado a detectores menos seletivos como os de absorbância (DAD) e/ou eletroquímicos (ED).

## IV.2 - OBJETIVOS

O objetivo geral deste capítulo foi o desenvolvimento e validação de método cromatográfico para a determinação de N-nitrosaminas em xampu, avaliando a potencialidade de diferentes sistemas de detecção associadas à cromatografia líquida de alta eficiência.

Os objetivos específicos compreenderam:

- (a) Otimização das condições cromatográficas para a separação das N-nitrosaminas, avaliando, para tanto, diferentes fases estacionárias e composição da fase móvel;
- (b) Avaliação de diferentes preparos de amostras;
- (c) Avaliação da potencialidade das técnicas HPLC-DAD, HPLC-ED, e LC/MS para a determinação de N-nitrosaminas em xampu;
- (d) Desenvolvimento de método para a confirmação de identidade de N-nitrosaminas em xampu, usando a técnica LC-MS/MS (Q ToF );
- (e) Desenvolvimento e validação de método para a determinação de N-nitrosaminas em xampu;
- (f) Análise de amostras de xampu comercializadas no Brasil.

## **IV.3 - MATERIAL E MÉTODOS**

### **IV.3.1 - Padrões Analíticos**

Os padrões analíticos de N-nitrosaminas (Sigma-Aldrich, EUA) utilizados foram: N-nitrosodietanolamina (99,99%), N-nitrosomorfolina (99,99%), N-nitrosodimetilamina (99,99%) e N-nitrosodietilamina (99,99%).

### **IV.3.2 - Reagentes e Soluções**

Todos os reagentes empregados neste trabalho foram de grau analítico e as soluções foram preparadas com água destilada e purificada em um sistema Milli-Q, modelo *Academic* (Millipore, EUA).

#### **IV.3.2.1 - Solução estoque de N-nitrosaminas**

As soluções estoque das NA foram preparadas na concentração de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , mediante diluição de volumes apropriados do padrão em água.

### **IV.3.3 - Equipamentos**

#### **IV.3.3.1 – Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector de arranjo de fotodiodos**

Inicialmente para otimização da separação das N-nitrosaminas sob estudo foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência composto por um sistema de bombeamento binário, modelo 1525, detector de arranjo de fotodiodos (DAD), modelo 2996 ambos da Waters (EUA) e um injetor da

Rheodyne 7725, com alça de amostragem de 50  $\mu\text{L}$ . A aquisição de dados foi realizada mediante programa computacional Millenium versão 4.0.

#### **IV.3.3.2 – Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector eletroquímico (célula *wall-jet*)**

Para os estudos com detecção eletroquímica foi utilizado o mesmo sistema cromatográfico utilizado para detecção por arranjo de fotodiodos (IV.3.3.1), porém, para a detecção foi utilizada uma célula eletroquímica (descrita no capítulo III), confeccionada no próprio laboratório, composta pelos seguintes eletrodos: eletrodo de trabalho, DDB 8000 ppm (área de  $144\text{ mm}^2$ ); eletrodo de referência, fio de platina e eletrodo auxiliar, disco de aço de  $133\text{ mm}^2$ . A célula foi operada por um potenciostato-galvanostato AUTOLAB PGSTAT 30 (ECO CHEMIE) e a aquisição dos dados e o gerenciamento do potenciostato foram realizados por um microcomputador (Dell) e mediante programa computacional GPES.

#### **IV.3.3.3 – Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector eletroquímico (célula *thin-layer*)**

Outro sistema de cromatografia utilizado neste trabalho foi composto por um sistema de bombeamento 818 IC Pump (Metrohm®), com detector eletroquímico Advanced Bioscan modelo 871 (Metrohm®), com alça de amostragem de 20  $\mu\text{L}$ . A célula amperométrica era composta por eletrodos de aço e platina como referência e auxiliar, respectivamente e como eletrodo de trabalho foi adaptado ao sistema um eletrodo de DDB 8000 ppm (área de  $78\text{ mm}^2$ ). A aquisição dos dados foi realizada por um microcomputador (Dell) e mediante programa computacional IC Net.



#### **IV.3.3.4 - Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector de espectrometria de massas**

Para os estudos com cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) foi utilizado um sistema de bombeamento quaternário, modelo 2695 Alliance (Waters), com injetor automático e alça de amostragem de 20 µL, associado a um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo, modelo 3100 (Waters) com ionização por *electrospray*. A aquisição dos dados foi realizada mediante programa computacional Empower (Waters).

#### **IV.3.3.5 - Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector de espectrometria de massas em *tandem***

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo líquido associado a um espectrômetro de massas, modelo QToF micro (Micromass,Waters). O equipamento é composto por um sistema de bombeamento quaternário, com injetor automático e alça de amostragem de 10 µL, associado a um sistema de espectrometria de massas híbrido composto por dois analisadores em série, quadrupolo e *Time of Flight* (Q ToF), e uma interface de ionização por *electrospray* (ESI). A aquisição dos dados foi realizada mediante programa computacional MassLynx (Waters).

#### **IV.3.3.6 - Medidas de pH**

Para medida do pH foi utilizado um pH-metro modelo OP-271 (Digimed DM-20, Brasil) e um eletrodo de vidro também da Digimed – Instrumentação Analítica. O eletrodo de vidro combinado foi diariamente calibrado com tampões comerciais de pH 4,01 e 6,86.

#### **IV.3.3.7 - Colunas cromatográficas**

Para a separação das NA foram avaliadas as seguintes colunas cromatográficas:

- C18, XTerra™, 250 x 4,6 mm; 5 µm (Waters, EUA);
- C8, XTerra™, 250 x 4,6 mm; 5 µm (Waters, EUA);
- Ciano, Microsorb-MV 100 Ciano, 250 x 4,6 mm; 5 µm (Varian, EUA);
- C18, XBridge™, 250 x 4,6 mm; 5 µm (Waters, EUA);
- C18, XTerra™, 150 mm x 2,1 mm; 3,5 µm (Waters, EUA)
- C18, Atlantis™, 100 mm x 2,1 mm, 3 µm; (Waters, EUA).

#### **IV.3.3.8 - Preparo de amostra**

Para o preparo de amostras foi utilizado uma câmara de vácuo do tipo *manifold*, com capacidade para 12 cartuchos de extração em fase sólida.

Para extração em fase sólida foram utilizados cartuchos de fase reversa a base de sílica Bond Elut C18 (Varian) e HLB-OASIS (Waters) de fase reversa polimérica ambos de 500 mg x 6 mL. Também foram recheados cartuchos no próprio laboratório utilizando sílica gel (60 200 mesh) e florisil (100 – 200 mesh), ambos J.T. Baker.

#### **IV.3.4 - Procedimento Experimental**

##### **IV.3.4.1 - Otimização das condições de separação das N-nitrosaminas por cromatografia líquida com detector de arranjo de fotodiodos**

Para otimização da separação cromatográfica das N-nitrosaminas foram avaliadas as colunas cromatográficas descritas em IV.3.3.6, exceto a Atlantis. A coluna Atlantis foi somente empregada nos estudos empregando o LC-MS.

Como fase móvel foi avaliada uma mistura de água (solvente A) e acetonitrila (solvente B), tanto em modo de eluição isocrática como por gradiente de eluição (**Tabela IV.1**.). A vazão foi de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ .

**Tabela IV.1** – Gradiente de eluição (Detecção DAD).

| Tempo (min) | A (%) | B(%) |
|-------------|-------|------|
| 0           | 100   | 0    |
| 0 - 3       | 100   | 0    |
| 3 - 8       | 85    | 15   |
| 8 - 15      | 100   | 0    |

Para este estudo foram injetados  $50 \mu\text{L}$  de uma solução da mistura das NA na concentração de  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para a detecção foram utilizados os comprimentos de onda de máxima absorção para cada uma das NA.

Foram construídas curvas analíticas no intervalo de  $0,070$  a  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  para NDELA, NDMA e NMOR, utilizando gradiente de eluição na condição descrita na Tabela IV.1.

#### IV.3.4.1.1 - Preparo de amostras I

Para o preparo de amostra I  $1,0 \text{ g}$  de amostra (precisão de  $\pm 0,1 \text{ mg}$ ) foi fortificada com NDELA, NDMA e NMOR nos seguintes níveis:  $0,20$ ;  $0,50$ ;  $1,0$  e  $2,5 \mu\text{g g}^{-1}$ .

A amostra fortificada foi transferida para um almofariz, adicionado de  $0,50 \text{ g}$  de sulfato de sódio anidro e o sorvente (sílica ou florisil) até completa sorção da fase aquosa. A fase sólida sorvida foi então transferida para um cartucho de extração em fase sólida previamente recheado com sílica ou florisil ( $1,0 \text{ g}$ ) e condicionado com  $3 \text{ mL}$  de hexano. Para lavagem foi utilizado  $2 \text{ mL}$  de hexano. O cartucho foi seco sob vácuo por  $10 \text{ min}$  e os analitos eluídos com  $5 \text{ mL}$  de diclorometano:acetona  $40:60 \text{ v/v}$ .

Todos os elutatos obtidos (fração de lavagem com hexano e demais eluições) foram concentrados sob fluxo de N<sub>2</sub> para evaporação do solvente. Os extratos foram ressuspensos em 500 µL de água deionizada, filtrado em filtro de seringa de 0,22 µm e injetados no cromatógrafo.

#### **IV.3.4.1.2- Preparo de amostras II**

No preparo de amostra II, 1,0 g de amostra (precisão de ± 0,1 mg) em um béquer, adicionado 500 µL de uma solução de ácido ascórbico 20 mg L<sup>-1</sup>, como inibidor de nitrosação e 4,5 mL de água Milli-Q. Essa mistura foi agitada por 30 min e em seguida percolada em um cartucho C18 (500 mg, Varian Bond Elut), previamente condicionado com 2 mL de MeOH e 2 mL de água. Os primeiros 2 mL eluídos do cartucho foram descartados e o restante foi recolhido em um balão volumétrico de 5 mL. Em seguida, um volume de 2 mL de H<sub>2</sub>O:ACN 95:5 v/v foi percolado no cartucho e o volume recolhido no mesmo balão volumétrico até completar volume. Antes da análise cromatográfica a solução foi filtrada em filtro de membrana de 0,22 µm.

#### **IV.3.4.1.3 - Curva analítica na matriz**

Para construção das curvas analíticas, 0,5 g de amostras de xampu (amostra 3) foram fortificadas com NDELA, NDMA e NMOR em cinco níveis de concentração: 1,0; 2,5; 5,0; 10 e 15 µg g<sup>-1</sup>. O procedimento de extração seguido foi o mesmo descrito no item IV.3.4.1.2.

#### **IV.3.4.2 - Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector eletroquímico (célula *wall-jet* e *thin-layer*)**

A avaliação, bem como a caracterização da célula eletroquímica, do tipo *wall-jet*, já foi apresentada no capítulo III.

À célula eletroquímica comercial, do tipo *thin-layer*, foi acoplado um eletrodo de diamante (área de 78 mm<sup>2</sup>), que foi embutido em Teflon.

Para avaliação dos detectores eletroquímicos foram construídas curvas analíticas no solvente para NDELA, NDMA e NMOR, no intervalo de 0,2 a 5,0 µg mL<sup>-1</sup>. A coluna utilizada foi C18, XBridge™ (250 x 4,6 mm; 5 µm, Waters) e as análises foram realizadas em uma condição isocrática, com fase móvel de fosfato de sódio 0,10 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0; vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Para célula tipo *wall-jet* foi injetado um volume de 50 µL e o potencial aplicado foi de 2,0 V vs Pt e para a célula tipo *thin-layer* foi utilizado volume de injeção de 20 µL e o potencial aplicado foi de 2,0 V vs aço.

Para construção das curvas analíticas, 0,5 g de amostras de xampu (amostra 3) foram fortificadas com NDELA, NDMA e NMOR no intervalo de 1,0 µg g<sup>-1</sup> a 15 µg g<sup>-1</sup>. O preparo de amostra empregado foi o descrito no item IV.3.4.1.2.

#### **IV.3.4.4 - Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector de espectrometria de massas (LC-MSMS QToF)**

Para estabelecer as condições de análise no espectrômetro de massas foram previamente avaliados e estabelecidos os seguintes parâmetros: voltagem do capilar (3500 V), voltagem do cone de amostragem (20 V), voltagem do cone de extração (3 V), temperatura de dessolvatação (350 °C), temperatura na fonte de ionização (120 °C), energia de ionização (2 V) e energia de colisão (5 V). O modo de ionização escolhido foi *electrospray* positivo. Esses parâmetros foram otimizados para cada NA isoladamente. Para esta avaliação foi infundido, com auxílio de uma bomba seringa na vazão de 5 µL min<sup>-1</sup>, cada uma das NA na concentração de 2,0 µg mL<sup>-1</sup>. Após otimização desses parâmetros foi injetado a mistura das NA na mesma concentração e vazão para otimização de um *tunning* que fosse adequado para todas.

Para a separação das NA foi utilizado uma coluna XTerra™ C18 (150 mm x 2,1 mm, 3,5 µm, Waters) e pré-coluna XTerra™ C<sub>18</sub> (10 mm x 2,1 mm, 3,5 µm,

Waters). A separação das NA foi realizada com eluição por gradiente nas condições especificadas na **Tabela IV.2**: solvente A (H<sub>2</sub>O) e solvente B (metanol). A vazão foi de 0,25 mL min<sup>-1</sup>.

**Tabela IV.2** – Gradiente de eluição (Detecção LC-MS/MS-QToF).

| Tempo (min) | A (%) | B (%) |
|-------------|-------|-------|
| 0           | 100   | 0     |
| 0 - 3       | 100   | 0     |
| 3 - 8       | 85    | 15    |
| 8 - 15      | 100   | 0     |

Foram construídas curvas analíticas no solvente para NDELA, NDMA e NMOR no intervalo de 0,5 a 5,0 µg mL<sup>-1</sup>, utilizando como padrão interno a NDEA, na concentração de 30,0 µg mL<sup>-1</sup>.

#### IV.3.4.4.1- Preparo de amostras

No intuito de selecionar uma amostra branco foram analisadas inicialmente 14 amostras de xampus. Essas amostras foram adquiridas no comércio na região de Campinas, SP.

Neste procedimento, 1,0 g de amostra (precisão de ± 0,1 mg) foi pesado diretamente em tubo de ensaio e adicionado de 5,0 mL de água Milli-Q. Essa mistura foi levada ao ultra-som por 10 min e em seguida percolado em um cartucho C18 (500 mg, Varian Bond Elut), previamente condicionado com 3 mL de MeOH e 3 mL de água. O volume da aplicação da amostra foi recolhido diretamente em balão volumétrico de 10 mL. Em seguida foram percolados pelo cartucho mais 2 mL de ACN:H<sub>2</sub>O (50:50 v/v), cujo eluato também foi recolhido no mesmo balão. O balão foi avolumado com água e a solução foi filtrada em filtro de seringa de 0,22 µm anterior análise.

#### IV.3.4.4.2 - Curva analítica na matriz

Para o preparo da curva analítica na matriz, 1,0 g de amostra branco de xampu (amostra 3) foram fortificadas com NDELA, NDMA e NMOR no intervalo de 2,5  $\mu\text{g g}^{-1}$  a 50,0  $\mu\text{g g}^{-1}$ . NDEA, em uma concentração de 150  $\mu\text{g g}^{-1}$ , foi empregada como padrão interno. O procedimento de extração foi o mesmo utilizado para o preparo de amostra descrito em IV.3.4.4.1.

#### IV.3.4.5 - Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector de espectrometria de massas (LC-MS)

As condições de *tunning* utilizadas foram, inicialmente, as mesmas otimizadas para o LC-MS/MS (Q ToF).

A coluna utilizada foi uma coluna C18 Atlantis™ (100 x 2,1 mm, 3  $\mu\text{m}$ , Waters) e pré-coluna C18 Atlantis™ (10 x 2,1 mm, 3  $\mu\text{m}$ , Waters). As medidas foram realizadas com eluição por gradiente nas condições especificadas na **Tabela IV.3**: solvente A (acetato de amônio 20 mmol L<sup>-1</sup>) e solvente B (acetato de amônio 20 mmol L<sup>-1</sup> (aq):metanol 10:90, v/v). A vazão foi de 0,25 mL min<sup>-1</sup>.

**Tabela IV.3** – Gradiente de eluição (Detecção LC-MS).

| Tempo (min) | A (%) | B (%) |
|-------------|-------|-------|
| 0           | 98    | 2     |
| 0 - 10      | 98    | 2     |
| 10 - 17     | 0     | 100   |
| 17 - 20     | 0     | 100   |
| 20 - 27     | 98    | 2     |
| 27 - 50     | 98    | 2     |

As condições do espectrômetro de massas foram: *electrospray* modo positivo, capilar: 3 V; cone: 20 V; temperatura da fonte: 120 °C; temperatura de dessolvatação: 350 °C.

#### **IV.3.4.5.1 - Preparo de amostras**

Uma massa de 1,0 g de amostra foi pesada em um tubo tipo falcon de 15 mL, adicionado 500  $\mu$ L de uma solução de ácido ascórbico 20 mg L<sup>-1</sup>, como inibidor de nitrosação e 4 mL de água Milli-Q. Essa mistura foi levada à agitação em vortex por 30 s e logo em seguida percolado em um cartucho C18 (500 mg, Varian Bond Elut), previamente condicionado com 2 mL de MeOH e 2 mL de H<sub>2</sub>O. Os primeiros 2 mL percolados foram descartados e os próximos 4 mL do eluato foram coletados para a quantificação da NDELA e NDMA. Em seguida, foram percolados mais 2 mL de H<sub>2</sub>O:ACN 95:5 v/v e uma nova porção do eluato (3 mL) coletados para a quantificação da NMOR. Os dois extratos foram filtrados em filtro de membrana de 0,22  $\mu$ m e analisados separadamente no cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas.

#### **IV.3.4.5.2 - Curva Analítica na matriz**

Foram construídas curvas analíticas tomando a amostra base de xampu como amostra branco. As curvas analíticas foram construídas para NDMA, NDELA e NMOR fortificando 1,0 g de xampu em sete níveis de concentração 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5  $\mu$ g g<sup>-1</sup>. Não foi empregado padrão interno nas análises. Após a fortificação da matriz o procedimento para o preparo de amostras foi aquele descrito em IV.3.4.5.1.

#### **IV.3.4.5.3 – Validação do método LC-MS**

Os parâmetros de validação avaliados foram: seletividade, linearidade, sensibilidade, intervalo (faixa linear), precisão, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão.



A seletividade no presente estudo foi realizada pela comparação dos cromatogramas obtidos para amostras branco de xampu (base) e amostras branco fortificadas com NDELA, NDMA e NMOR.

As curvas analíticas foram construídas conforme descrito em IV.3.4.5.2. A faixa linear foi estabelecida mediante avaliação da linearidade e pelo gráfico de resíduos. A linearidade e sensibilidade foram expressas pelo coeficiente de regressão linear ( $r$ ) e pelo coeficiente angular da curva analítica, respectivamente.

Os limites de detecção (LOD) para cada uma das N-nitrosaminas foram determinadas a partir da razão sinal/ruído igual a 3, nos tempos de retenção das mesmas, em amostras branco de xampu.

Os limites de quantificação (LOQ) para cada uma das N-nitrosaminas foram determinados a partir da razão sinal/ruído igual a 10, nos tempos de retenção das mesmas, em amostras branco de xampu.

A precisão intra-ensaios foi obtida para três níveis de concentração (0,50; 0,75 e 1,0  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) para cada NA, mediante fortificação de amostras branco. Todas as análises foram realizadas em quintuplicata, em um mesmo dia, pelo mesmo analista, no mesmo equipamento. Os resultados foram expressos como as estimativas dos desvios padrão relativos (RSD).

A precisão inter-ensaios foi obtida para três níveis de concentração (0,50; 0,75 e 1,0  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) para cada NA, mediante fortificação de amostras branco. As análises foram realizadas em quintuplicatas em dois dias diferentes, pelo mesmo analista e no mesmo equipamento. Os resultados foram expressos como as estimativas dos desvios padrão relativos (RSD).

A exatidão do método foi avaliada mediante testes de recuperação. Para tanto, amostras branco de xampu (base) foram fortificadas com os analitos em concentrações correspondentes a três níveis de concentração (0,50; 0,75 e 1,0  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). As análises foram realizadas em quintuplicata e os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de recuperação.

## IV.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido à grande variedade de amins contidas nas matérias-primas que são utilizadas no preparo de xampus e da possível presença de agentes nitrosantes, existe a possibilidade da formação de diversas NA na formulação final. Entre as NA detectadas em cosméticos destacam-se a NDELA, NMOR e NDMA e, portanto, essas foram as moléculas alvo do presente estudo. Embora a maioria dos trabalhos sobre contaminação de cosméticos por NA foi gerada nas décadas de 80 e 90, ainda existem relatos sobre a presença de NA em cosméticos e produtos de higiene. Cabe destacar que não foi encontrado trabalho na literatura científica que reporte a análise de produtos de higiene provenientes do mercado nacional quanto a presença de NA.

Para desenvolver um método analítico é importante estabelecer a concentração mínima que o método é capaz de quantificar. Para análise de resíduos, de modo geral, toma-se como base para contaminantes os valores máximos permitidos por legislação. No entanto, no caso das NA não existe legislação específica. Diretrizes das agências reguladoras como ANVISA e da Comunidade Européia apenas estabelecem valores limites de contaminantes, entre esses NA, em matérias-primas destinadas à formulação de produtos de higiene ou cosméticos. O valor máximo permitido de N-nitrosaminas em matérias-primas é de  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Não existem recomendações para um limite máximo de resíduo aceitável de N-nitrosaminas em produtos acabados.

A princípio foram avaliados diferentes métodos no intuito de comparar detectabilidade e seletividade na quantificação de NA em xampu. Além da falta de legislação específica é necessário considerar que a matriz xampu é complexa e que a composição da matriz varia de fabricante para fabricante. A princípio teve que se trabalhar com o fato de que seria necessário encontrar uma amostra branco, ou seja, isenta das NA em estudo.

A seguir são apresentados os resultados obtidos para a determinação de NA em xampu usando métodos HPLC-DAD, HPLC-ED (detetor amperométrico com eletrodo de diamante dopado com boro), LC-MS/MS e LC-MS. Para cada

técnica foram avaliados diferentes preparos de amostra, no intuito de alcançar a seletividade necessária e menor detectabilidade possível.

#### **IV.4.1 - Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector de arranjo de fotodiodos (HPLC-DAD)**

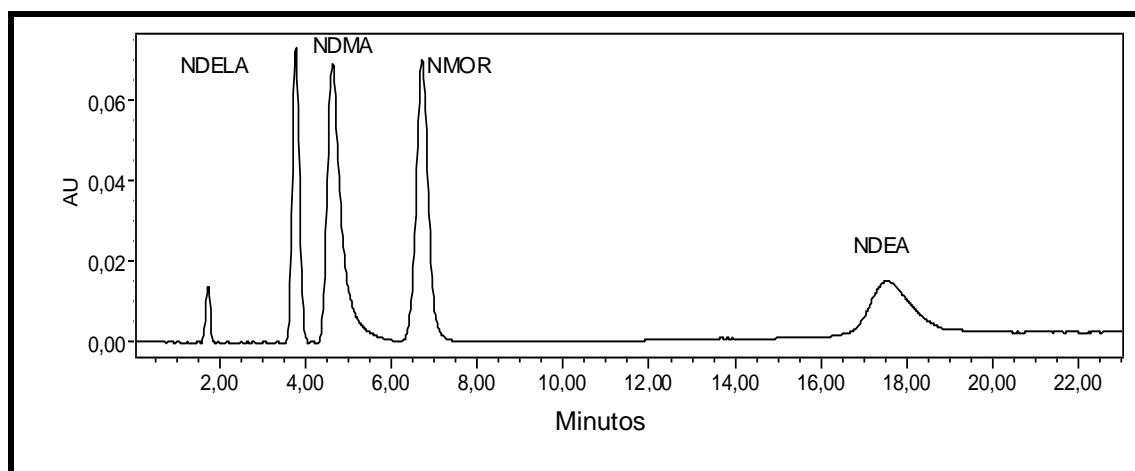
##### **IV.4.1.1 - Separação das N-nitrosaminas por cromatografia líquida de alta eficiência**

As N-nitrosaminas em estudo apresentam polaridades diferentes entre si. As N-nitrosaminas alifáticas de cadeia linear (NDMA e NDEA) são mais apolares que a NDELA. A NMOR tem uma polaridade intermediária. Vale ressaltar que a NDMA e NDEA, por apresentarem baixa pressão de vapor, geralmente são determinadas por cromatografia a gás. Para avaliar a separação de todas as N-nitrosaminas por HPLC foram avaliadas quatro fases estacionárias: duas C18 e uma C8, compostas de sílica híbrida, e uma ciano.

Para a detecção foram utilizados os comprimentos de onda de máxima absorção para cada uma das NA e o volume de injeção foi de 50 µL.

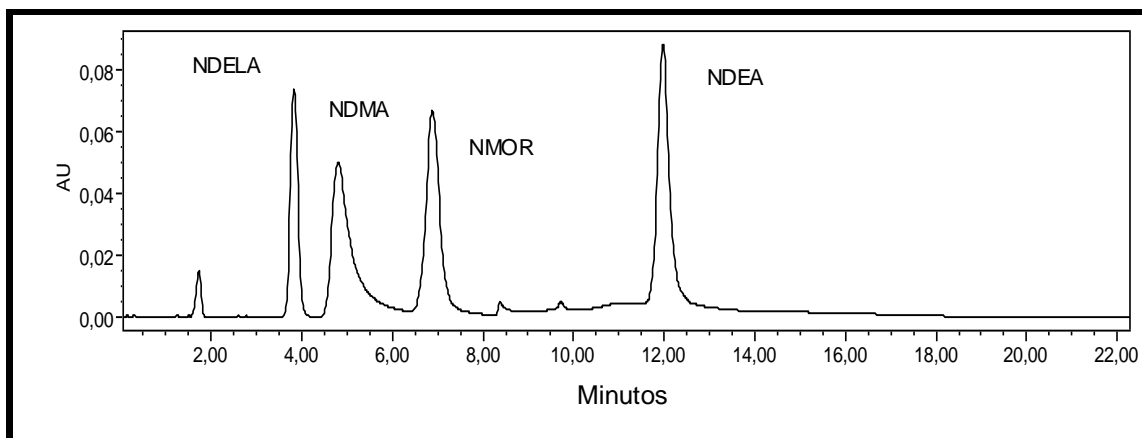
Inicialmente, e de acordo com informações da literatura a cerca da separação destes compostos, o tipo de coluna mais comumente utilizada é constituída por fase estacionária octadecil. Sendo assim, os estudos foram iniciados com este tipo de fase estacionária .

Um cromatograma característico, usando a fase estacionária C18 XTerra™ está apresentado na **Figura IV.1**.



**Figura IV.1.**— Cromatograma para mistura de NDELA, NDMA, NMOR e NDEA na concentração de  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  em água. Coluna C18 XTerra™. Fase móvel água. Volume de injeção  $50 \mu\text{L}$  e vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Detector: DAD,  $\lambda = 240 \text{ nm}$ .

Como pode ser observado no cromatograma, ocorre a separação total das quatro NA estudadas nesta coluna, porém a NDEA possui um tempo de retenção muito alto em comparação com as demais, devido ao seu caráter mais apolar que favorece maior interação com a fase estacionária. Além disso, o pico para NDMA apresentou um fator de assimetria não adequado (pico com cauda). No intuito de melhorar a simetria do pico da NDMA e diminuir o tempo de retenção da NDEA foi testado a eluição por gradiente, usando acetonitrila (ACN) na fase móvel. O gradiente avaliado foi: 0 – 3 min 100%  $\text{H}_2\text{O}$ , de 3 – 8 min  $\text{H}_2\text{O}$ :ACN 85:15 v/v e de 8 – 15 min, voltando à proporção inicial de 100%  $\text{H}_2\text{O}$ . Um cromatograma característico obtido nestas condições está apresentado na **Figura IV.2**.



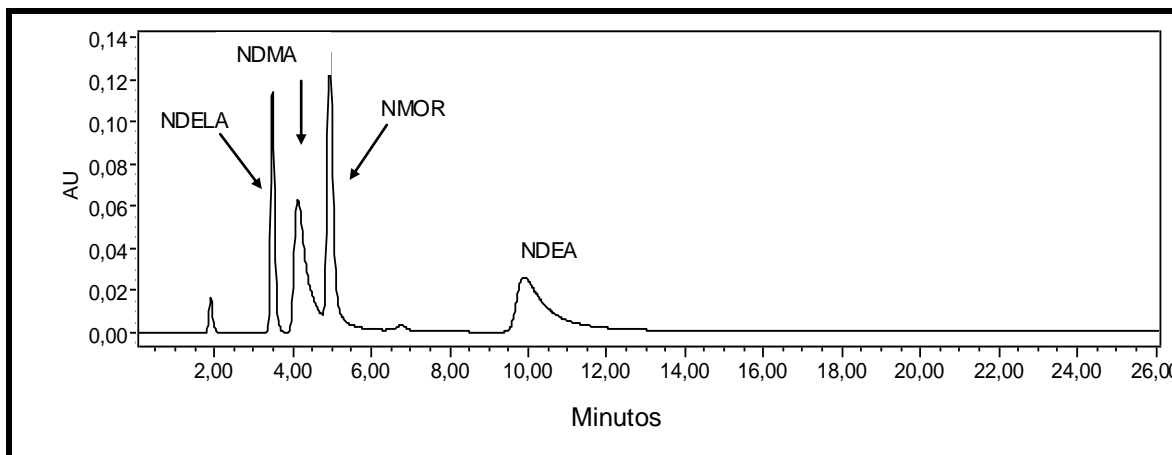
**Figura IV.2**– Cromatograma para mistura de NDELA, NDMA, NMOR e NDEA na concentração de  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  em água. Coluna C18 XTerra™. Fase móvel ACN:H<sub>2</sub>O com eluição por gradiente (**Tabela IV.1**). Volume de injeção  $50 \mu\text{L}$  e vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Detector: DAD,  $\lambda = 240 \text{ nm}$ .

Embora tenha sido possível diminuir o tempo de retenção da NDEA nestas condições, a simetria dos picos, em particular a NDMA, não foi melhorada. Tendo em vista que a NDELA e NDMA apresentam um tempo de retenção muito reduzido na fase octadecil e a fase móvel é água (solvente mais fraco), não seria possível melhorar a separação alterando a composição do solvente. Portanto, foram avaliadas outras fases estacionárias, entre essas duas de caráter mais polar que a octadecil. As colunas avaliadas foram C8, ciano e outra C18 de sílica híbrida (XBridge™). Esta última embora seja igualmente uma C18 é diferente da XTerra™.

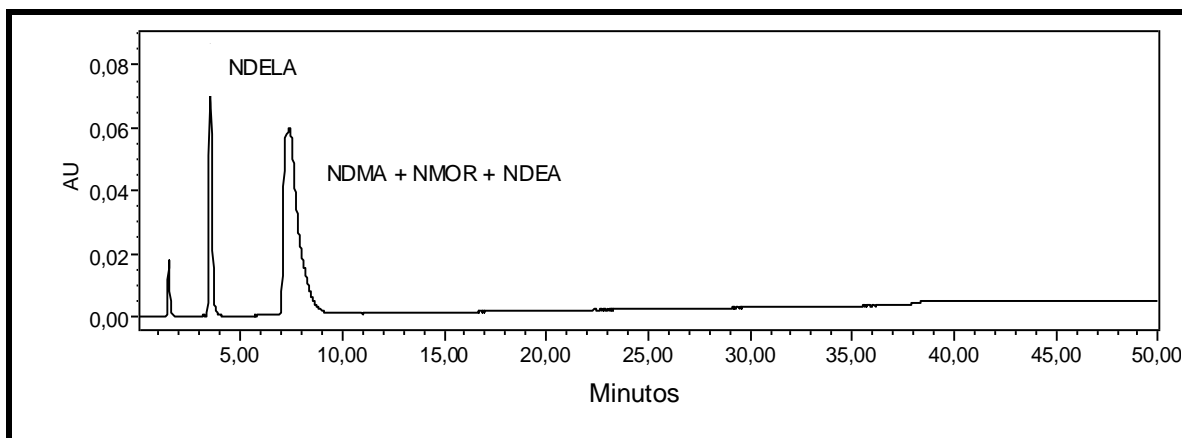
As colunas X-Terra são a primeira geração de sílica híbrida e são baseadas em uma mistura dos monômeros tetraetoxissilano e metiltrietoxissilano. As colunas X-Bridge tem fase baseada na sílica híbrida de segunda geração, que emprega os monômeros tetraetilssilano e bis(trietoxisilil)etano. Uma importante diferença entre as duas fases, é que a X-Terra tem grupos metila incorporados na superfície e na estrutura interna de suas partículas e uma concentração

relativamente baixa de grupos C18 ligados. Para a X-Bridge, a maioria das pontes de etila residem na estrutura interna do material suportando maior densidade de ligação de grupos C18 na superfície.

Os cromatogramas obtidos com as outras fases estacionárias estão apresentados nas **Figuras IV.3 a IV.6**:



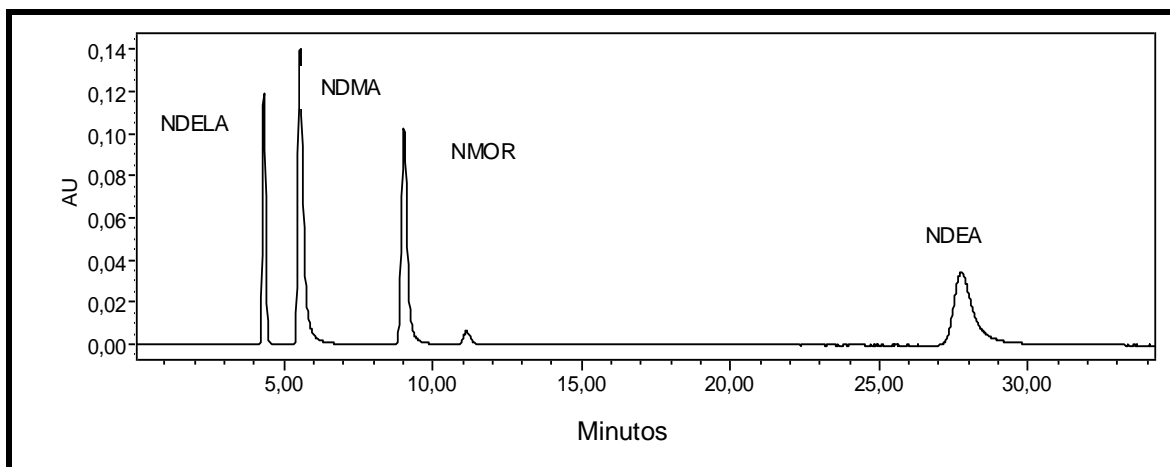
**Figura IV.3** – Cromatograma para mistura de NDELA, NDMA, NMOR e NDEA na concentração de  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  em água. Coluna C8 XTerra™. Fase móvel água. Volume de injeção  $50 \mu\text{L}$  e vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Detector: DAD,  $\lambda = 240 \text{ nm}$ .



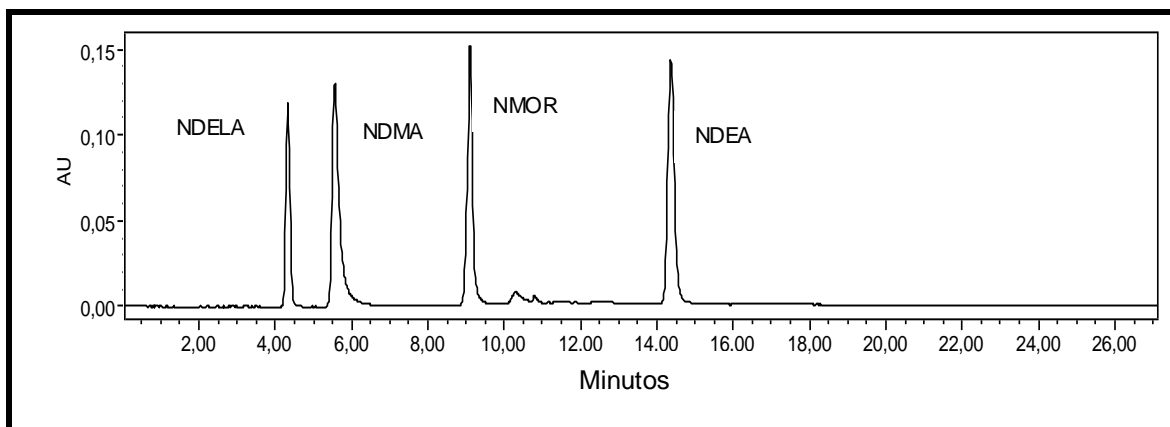
**Figura IV.4** – Cromatograma para mistura de NDELA, NDMA, NMOR e NDEA na concentração de  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  em água. Coluna ciano. Fase móvel água. Volume de injeção  $50 \mu\text{L}$  e vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Detector: DAD,  $\lambda = 240 \text{ nm}$ .

As fases estacionárias C8 e ciano não apresentaram melhores resultados dos parâmetros cromatográficos em relação à primeira fase estacionária avaliada (octadecil Xterra<sup>TM</sup>). A assimetria dos picos, principalmente da NDMA, pode ser justificada pela interação de grupos silanóis residuais das fases estacionárias, que tem caráter ácido, o que prejudica a separação de compostos básicos.

Um cromatograma característico usando a coluna C18 XBridge<sup>TM</sup> está apresentado na **Figura IV.5**. Como fase móvel foi empregada água inicialmente. Nesta coluna a simetria dos picos ficou melhor e, portanto, foi adicionado acetonitrila na fase móvel (água) para diminuir o tempo de retenção da NDEA (**Figura IV.6**).



**Figura IV.5** – Cromatograma para mistura de NDELA, NDMA, NMOR e NDEA na concentração de  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  em água. Coluna C18 XBridge™. Fase móvel: água. Volume de injeção  $50 \mu\text{L}$  e vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Detector: DAD,  $\lambda = 240 \text{ nm}$ .



**Figura IV.6** – Cromatograma para mistura de NDELA, NDMA, NMOR e NDEA na concentração de  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  em água. Coluna C18 XBridge™. Fase móvel: ACN:H<sub>2</sub>O. Eluição por gradiente (**Tabela IV.1**). Volume de injeção  $50 \mu\text{L}$  e vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Detector: DAD,  $\lambda = 240 \text{ nm}$ .

Os parâmetros cromatográficos para as duas colunas C18 estão apresentados na **Tabela IV.4**.



**Tabela IV.4** - Parâmetros cromatográficos obtidos para as Colunas C18 XTerra™ e C18 XBridge™

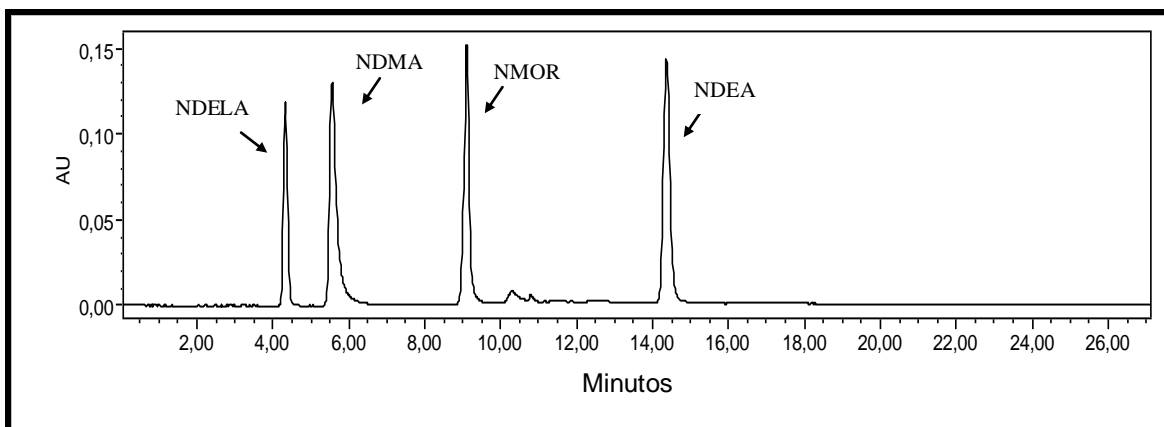
| Nitrosaminas           | Resolução * | Fator de assimetria | Número de pratos |
|------------------------|-------------|---------------------|------------------|
| <b>Coluna XTerra™</b>  |             |                     |                  |
| NDELA                  |             | 1,07                | 2,33e+3          |
| NDMA                   | 1,96        | 2,17                | 7,98e+2          |
| NMOR                   | 3,43        | 1,14                | 2,64e+3          |
| NDEA                   | 5,85        | 1,27                | 1,08e+4          |
| <b>Coluna XBridge™</b> |             |                     |                  |
| NDELA                  |             | 1,12                | 7,93e+3          |
| NDMA                   | 4,82        | 1,77                | 4,90e+3          |
| NMOR                   | 13,18       | 1,03                | 2,71e+4          |
| NDEA                   | 13,19       | 1,14                | 3,38e+4          |

\*Resolução entre picos adjacentes.

Os melhores parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico foram obtidos com a coluna C18 XBridge™ e são aceitáveis ( $R_s > 1,25$ ;  $N > 2000$  e fator de simetria  $< 1,7$ ). Apenas o fator de assimetria do pico da NDMA foi maior do 1,7.

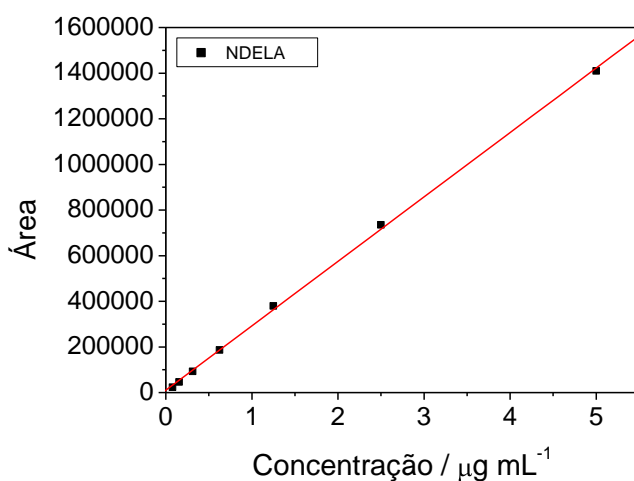
#### IV.4.1.2 - Curva analítica

Após a otimização da separação das NA foram construídas curvas analíticas no solvente a fim de se estabelecer uma faixa linear de trabalho. Para tanto, foi utilizado a coluna C18 Xbridge™, fase móvel com eluição gradiente, utilizando H<sub>2</sub>O e ACN na seguinte condição: 100% H<sub>2</sub>O de 0 a 3,0 min; mudando para H<sub>2</sub>O:ACN 85:15 v/v de 3,0 a 8,0 min e voltando à proporção inicial de 100% H<sub>2</sub>O de 8,0 a 15,0 min. Um cromatograma característico está apresentado na **Figura IV.7**.

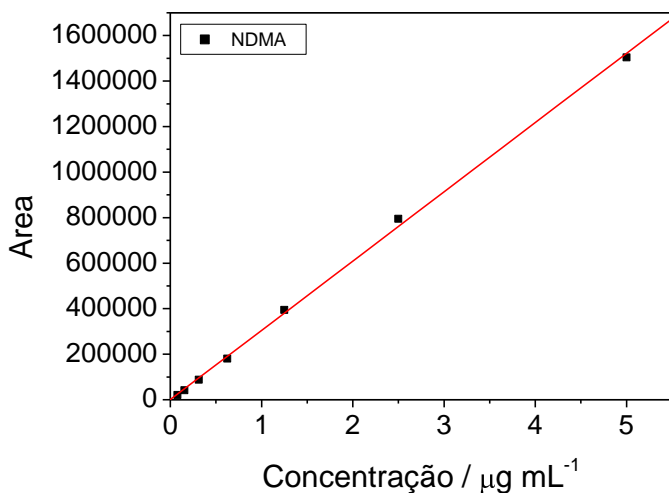


**Figura IV.7** – Cromatograma para mistura de NDELA, NDMA, NMOR e NDEA na concentração de  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  em água. Coluna C18 XBridge™. Fase móvel, ACN:H<sub>2</sub>O. Eluição por gradiente (**Tabela IV.1**). Volume de injeção  $50 \mu\text{L}$  e vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Detector: DAD,  $\lambda = 240 \text{ nm}$ .

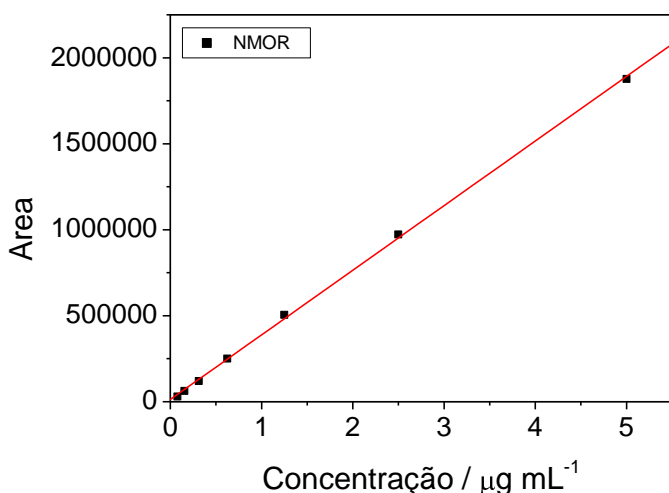
As curvas analíticas no solvente construídas para a NDELA, NDMA e NMOR no intervalo de concentração de  $0,070$  a  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  são apresentadas nas **Figuras IV.8-10** e os parâmetros obtidos através destas encontram-se descritas na **Tabela IV.5**.



**Figura IV.8** - Curva analítica para N-nitrosodietanolamina em água no intervalo de  $0,070$  a  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  Coluna C18 XBridge™. Fase móvel, ACN:H<sub>2</sub>O. Eluição por gradiente (**Tabela IV.1**). Volume de injeção  $50 \mu\text{L}$  e vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Detector: DAD,  $\lambda = 240 \text{ nm}$ .



**Figura IV.9** - Curva analítica para N-nitrosodimetilamina em água no intervalo de 0,070 a 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Coluna C18 XBridge™. Fase móvel, ACN:H<sub>2</sub>O. Eluição por gradiente (**Tabela IV.1**). Volume de injeção 50  $\mu\text{L}$  e vazão de 1  $\text{mL min}^{-1}$ . Detector: DAD,  $\lambda = 240 \text{ nm}$ .



**Figura IV.10** - Curva analítica para N-nitrosomorfolina em água no intervalo de 0,070 a 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Coluna C18 XBridge™. Fase móvel, ACN:H<sub>2</sub>O. Eluição por gradiente (**Tabela IV.1**). Volume de injeção 50  $\mu\text{L}$  e vazão de 1  $\text{mL min}^{-1}$ . Detector: DAD,  $\lambda = 240 \text{ nm}$ .

**Tabela IV.5** – Parâmetros obtidos das curvas analíticas para as N-nitrosaminas utilizando HPLC-DAD.

| Parâmetros  | NDELA       | NDMA        | NMOR        |
|---|-------------|-------------|-------------|
| Faixa Linear ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )                        | 0,070 a 5,0 | 0,070 a 5,0 | 0,070 a 5,0 |
| Linearidade   | 0,999       | 0,999       | 0,999       |
| Sensibilidade ( $\times 10^3$ )<br>uA*/ $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 282,4       | 304,3       | 375,7       |
| LDI ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )                                 | 0,02        | 0,02        | 0,02        |

\*uA: unidade de área. (\*\*) LDI: limite de detecção do instrumento.

A partir das curvas foi estimado o limite de detecção do instrumento, ou seja, a menor concentração possível de ser detectada pelo instrumento. Esse valor foi usado como base para delinear o preparo de amostra, em especial o fator de concentração.

#### **IV.4.1.3 - Preparo de amostras**

Inicialmente foram avaliados procedimentos envolvendo a extração em fase sólida utilizando cartuchos com fase octadecil (os resultados obtidos serão discutidos no tópico IV.4.2.3). No entanto, diante de um limite de quantificação não satisfatório usando cartuchos octadecil, foram avaliados também outros procedimentos de preparo de amostra, visando uma maior concentração dos analitos. As NA de caráter mais polar não tem afinidade pela fase C18 e neste caso a fase apenas tem a função de limpeza da amostra e não de uma concentração dos analitos.

Um dos procedimentos avaliados foi a dispersão de matriz em fase sólida (procedimento descrito no item IV.3.4.1.1). Os sorventes utilizados foram sílica gel e/ou florissil.

Neste procedimento foram utilizados sorventes de caráter polar para reter as N-nitrosaminas durante o processo de extração e limpeza e assim, possibilitar uma concentração das mesmas.

Devido ao fato das amostras utilizadas neste trabalho (xampu) apresentarem grande quantidade de água e a não compatibilidade deste meio com materiais de caráter polar como sílica e florissil, foi necessário dispersar a matriz no material sorvente antes da aplicação do mesmo no cartucho de extração em fase sólida.

Antes de trabalhar com a matriz do xampu o processo de extração foi avaliado para NA dissolvidas em solvente (água). Isso foi importante para estabelecer os volumes adequados para efetuar a lavagem e eluição sem comprometer, contudo, a eficiência de extração.

Sendo assim, alíquotas de 250  $\mu\text{L}$  de uma mistura de NDELA, NDMA e NMOR na concentração de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foram transferidas para um almofariz, adicionado 0,50 g de sulfato de sódio anidro e adicionado o sorvente (sílica ou florisil) até completa sorção da fase aquosa. A fase sólida sorvida foi então transferida para um cartucho de extração em fase sólida previamente recheado com sílica ou florisil (1,0 g) e condicionado com 3 mL de hexano. Para lavagem foram utilizados 2 mL de hexano. Por último o cartucho foi seco sob vácuo por 10 min e os analitos eluídos com um dos seguintes solventes:

- (A) 5,0 mL de diclorometano/metanol (95:5 v/v);
- (B) 5,0 mL de diclorometano/metanol (90:10 v/v);
- (C) 5,0 mL de diclorometano/metanol acidificado com 1% ácido fórmico (90:10 v/v);
- (D) 5,0 mL diclorometano/acetona (40:60 v/v);
- (E) 5,0 mL acetona.

Todos os elutatos obtidos (fração de lavagem com hexano e demais eluições) foram concentrados sob fluxo de  $\text{N}_2$  para evaporação do solvente. Os extratos foram ressuspensos em 500  $\mu\text{L}$  de água, filtrado em filtro de seringa de 0,22  $\mu\text{m}$  e injetados no cromatógrafo.

Foram testados cartuchos recheados de sílica ou florisil (500 mg), assim como sílica ou florisil foram usadas para a dispersão da matriz.

Os melhores resultados em termos de recuperação foram obtidos usando a sílica para dispersar a matriz com adição de sulfato de sódio anidro e o cartucho de extração de fase sólida recheado com florisil.

Escolhido o melhor sorvente foi então otimizada a porcentagem e o volume do solvente utilizado para eluição das NA. Os valores obtidos para recuperação, bem como os volumes utilizados se encontram descritos na **Tabela IV.6**.

**Tabela IV.6** – Teste de recuperação avaliando diferentes solventes na eluição da NDELA, NDMA e NMOR ( $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) no cartucho florisil, recheado com sílica após sorção da mistura aquosa de N-nitrosaminas

| Solventes  | volume<br>(mL) | Recuperação (%) |           |           |
|--|----------------|-----------------|-----------|-----------|
|  |                | NDELA           | NDMA      | NMOR      |
| DCM/MeOH (95:5 v/v)                                    | 5              | 12              | n.d.      | 7         |
| DCM/ MeOH (90:10 v/v)                                  | 5              | 49              | n.d.      | 23        |
| DCM/ MeOH (90:10 v/v)                                  | 10             | 58              | 3         | 40        |
| DCM/ MeOH acidificado com 1% ácido fórmico (90:10 v/v) | 10             | 66              | <b>32</b> | <b>62</b> |
| DCM/ MeOH acidificado com 1% ácido fórmico (90:10 v/v) | 15             | 88              | 9         | 44        |
| DCM//acetona (40:60 v/v)                               | 5              | <b>96</b>       | n.d.      | 25        |
| Acetona  | 5              | 76              | 14        | 52        |

n.d.: não detectado; DCM: diclorometano; MeOH: metanol.

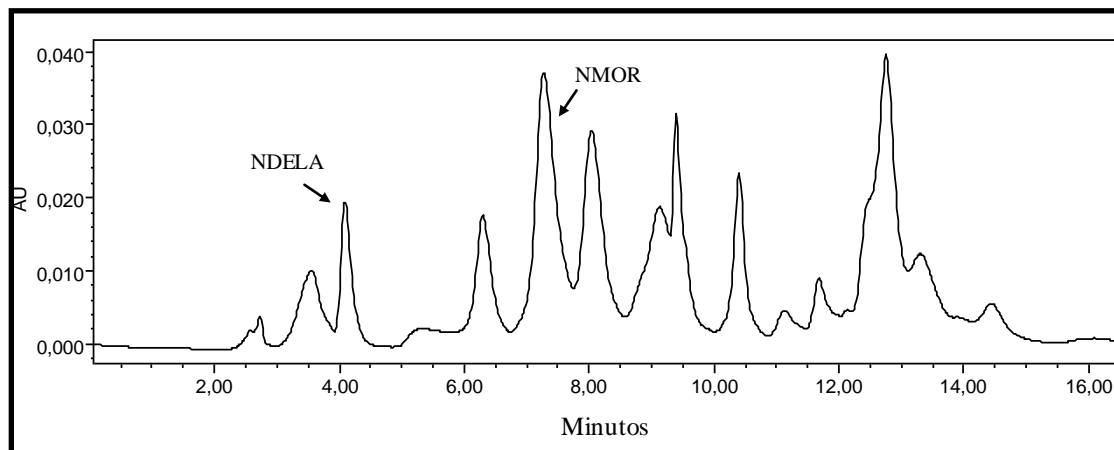
A baixa recuperação da NDMA poderia ser decorrente de perda desta durante etapa de secagem com nitrogênio, uma vez que essa NA é volátil. No entanto, foi verificado que essa perda não ocorre nas condições do teste.

A partir dos dados da **Tabela IV.6** é possível verificar que a eficiência de extração depende da NA e do solvente de eluição empregado. Para NDELA a maior porcentagem de recuperação foi de 96%, utilizando como solvente de eluição 5 mL de diclorometano:acetona 40:60 v/v. Para NDMA e NMOR a maior porcentagem de recuperação foi de 32% e 62%, respectivamente, empregando 10 mL de DCM:metanol acidificado com 1% de ácido fórmico, 90:10 v/v.

A baixa recuperação da NDMA pode ser explicada pelo caráter apolar da molécula e, conseqüentemente, a fraca interação com a fase estacionária polar.

Para avaliar o procedimento de extração com o xampu, uma amostra branco foi fortificada com NDELA, NDMA e NMOR e empregado o procedimento anteriormente descrito (IV.3.4.1.1). O solvente de eluição foi DCM:acetona 40:60 v/v. No início, optou-se por essa mistura de solventes, uma vez que a partir de dados da literatura (FAN *et al.*, 1977; KLEIN *et al.*, 1981; SCHOTHORST & STEPHANY, 2001; WANG *et al.*, 2006) a NDELA é a NA que mais foi encontrada

em xampus. Porém, o que pode ser observado foi que alterando a polaridade do solvente para aumentar a eficiência de extração das NA, também houve um incremento da eluição de interferentes (**Figura IV.11**).



**Figura IV.11** - Cromatograma obtido para amostra de xampu fortificada com NDELA, NDMA e NMOR num nível de  $2,5 \mu\text{g g}^{-1}$ , sorvida em sílica, empacotado em cartucho florisil e eluida com 5 mL DCM:acetona 40:60 v/v. Coluna C18 XBridge™: Fase móvel:ACN:H<sub>2</sub>O. Eluição por gradiente (**Tabela IV.1**). Volume de injeção 50  $\mu\text{L}$  e vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Detector: DAD,  $\lambda = 240 \text{ nm}$ .

O cromatograma obtido revela um grande número de interferentes, em particular de caráter apolar, impossibilitando a quantificação das NA sob estudo, usando o detector de fotodiodos (DAD). Diante dos resultados obtidos e da falta de seletividade do detector utilizado foram avaliados outros procedimentos de preparo de amostra. Dessa forma, novamente foi avaliado o preparo de amostras usando cartuchos de fase reversa, numa tentativa de diminuir os interferentes apolares eluídos.

Sendo assim, foi testado um procedimento baseado na norma recomendada pelo Ministério da Saúde na Alemanha para controle de NA em produtos cosméticos (LGC/GC/2007/002 – Alemanha). Foram avaliadas diferentes fases octadecil: a base de sílica (Varian Bond Elut C<sub>18</sub> e Analítica C<sub>18</sub>) e de fase reversa polimérica (HLB-OASIS, Waters). Para esses estudos, foram pesados

exatamente 2,0 g de amostra em um béquer, adicionados 20 mL de água e 240  $\mu\text{L}$  de uma solução da mistura de NA na concentração de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Essa mistura foi agitada por 30 min e centrifugada por 20 min. O sobrenadante foi percolado pelo cartucho de SPE, previamente condicionado com 2 mL de MeOH e 2 mL de água. Foram então recolhidas frações dos eluatos da seguinte forma: primeiros 2 mL (eluato 1), os 3 mL seguintes (eluato 2), eluição com 1 mL ( $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  acidificada,  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  95:5 v/v ou  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  85:15 v/v) (eluato 3) e por último, eluição com 1 mL com os mesmos solventes citados anteriormente (eluato 4). É importante observar que os eluatos 1 e 2 contem o solvente da amostra, ou seja, é o *clean-up* da própria amostra.

Este estudo foi realizado para avaliação da fração onde se pode obter a maior recuperação das NA em estudo. Após a eluição, essas soluções foram filtradas em filtro de membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  e analisadas por HPLC-DAD.

Inicialmente foi testado o cartucho Varian Bond Elut  $\text{C}_{18}$ , com eluição dos analitos com os seguintes solventes  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  acidificada ou  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  95:5 v/v. Os resultados das porcentagens de recuperação encontram-se nas **Tabelas IV.7, IV.8 e IV.9**.

**Tabela IV.7** – Eficiência de extração (% de recuperação) para amostra de xampu fortificada com 12  $\mu\text{g g}^{-1}$  de NDELA, NDMA e NMOR. Cartucho Varian Bond Elut  $\text{C}_{18}$  Eluição com  $\text{H}_2\text{O}$

| Eluição                               | Recuperação (%) |      |      |
|---------------------------------------|-----------------|------|------|
|                                       | NDELA           | NDMA | NMOR |
| Eluato 1 (2 mL)                       | 2               | -    | -    |
| Eluato 2 (3 mL)                       | 100             | 46   | -    |
| Eluato 3 (1 mL $\text{H}_2\text{O}$ ) | 31              | 34   | 42   |
| Eluato 4 (1 mL $\text{H}_2\text{O}$ ) | 4               | 26   | 47   |



**Tabela IV.8** – Eficiência de extração (% de recuperação) para amostra de xampu fortificada com  $12 \mu\text{g g}^{-1}$  de NDELA, NDMA e NMOR. Cartucho Varian Bond Elut  $\text{C}_{18}$  Eluição com  $\text{H}_2\text{O}$  com 1% de ácido fórmico v/v

| Eluição  | Recuperação (%) |      |      |
|--|-----------------|------|------|
|  | NDELA           | NDMA | NMOR |
| Eluato 1 (2 mL)  | 2               | -    | -    |
| Eluato 2 (3 mL)  | 103             | 65   | -    |
| Eluato 3 (1 mL $\text{H}_2\text{O}$ com 1% de ácido fórmico v/v) | 35              | 45   | 23   |
| Eluato 4 (1 mL $\text{H}_2\text{O}$ com 1% de ácido fórmico v/v) | 6               | 38   | 48   |

**Tabela IV.9** – Eficiência de extração (% de recuperação) para amostra de xampu fortificada com  $12 \mu\text{g g}^{-1}$  de NDELA, NDMA e NMOR. Cartucho Varian Bond Elut  $\text{C}_{18}$  Eluição com  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  95:5 v/v

| Eluição  | Recuperação (%) |      |      |
|--|-----------------|------|------|
|  | NDELA           | NDMA | NMOR |
| Eluato 1 (2 mL)  | 3               | -    | -    |
| Eluato 2 (3 mL)  | 104             | 64   | -    |
| Eluato 3 (1 mL $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 95:5 v/v) | 34              | 46   | 22   |
| Eluato 4 (1 mL $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 95:5 v/v) | 7               | 46   | 109  |

De acordo com os resultados de recuperação obtidos é possível verificar que a NMOR não é eluída junto com a amostra, ou seja, não é recuperada nos eluatos 1 e 2, devido a sua maior interação com a fase estacionária apolar. A remoção da NMOR da fase octadecil é favorecida pela adição de acetonitrila ao solvente aquoso (**Tabela IV.9**). A recuperação maior que 100%, somando-se os teores de todas as frações, indica a coeluição de interferentes, ou seja, o detector de arranjo de diodos não apresenta a seletividade requerida.

Tentando estabelecer uma condição única que pudesse favorecer a recuperação de todas as NA, optou-se por avaliar o procedimento empregando como solvente de eluição  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  95:5 v/v e empregando os outros dois

cartuchos: HLB-OASIS e Analítica C<sub>18</sub>. O procedimento seguido foi o mesmo adotado anteriormente para o cartucho Varian Bond Elut C<sub>18</sub>. Os resultados de recuperação são mostrados nas **Tabelas IV.10 e IV.11**.

**Tabela IV.10** – Teste de recuperação para amostra de xampu fortificada com 12 µg g<sup>-1</sup> de NDELA, NDMA e NMOR no cartucho HLB-OASIS e eluido com H<sub>2</sub>O/ACN 95:5 v/v

| Eluição                                       | Recuperação (%) |      |      |
|---|-----------------|------|------|
|   | NDELA           | NDMA | NMOR |
| Eluato 1 (2 mL)                               | -               | -    | -    |
| Eluato 2 (3 mL)                               | 105             | 14   | -    |
| Eluato 3 (1 mL H <sub>2</sub> O/ACN 95:5 v/v) | 41              | 52   | 2    |
| Eluato 4 (1 mL H <sub>2</sub> O/ACN 95:5 v/v) | -               | -    | -    |

**Tabela IV.11** – Teste de recuperação para amostra de xampu fortificada com 12 µg g<sup>-1</sup> de NDELA, NDMA e NMOR no cartucho Analítica C<sub>18</sub> e eluido com H<sub>2</sub>O/ACN 95:5 v/v

| Eluição   | Recuperação (%) |      |      |
|---|-----------------|------|------|
|   | NDELA           | NDMA | NMOR |
| Eluato 1 (2 mL)   | -               | -    | -    |
| Eluato 2 (3 mL)   | 104             | -    | -    |
| Eluato 3 (eluido com 1 mL H <sub>2</sub> O/ACN 95:5 v/v)      | -               | -    | -    |
| Eluato 4 (eluido com mais 1 mL H <sub>2</sub> O/ACN 95:5 v/v) | -               | -    | -    |

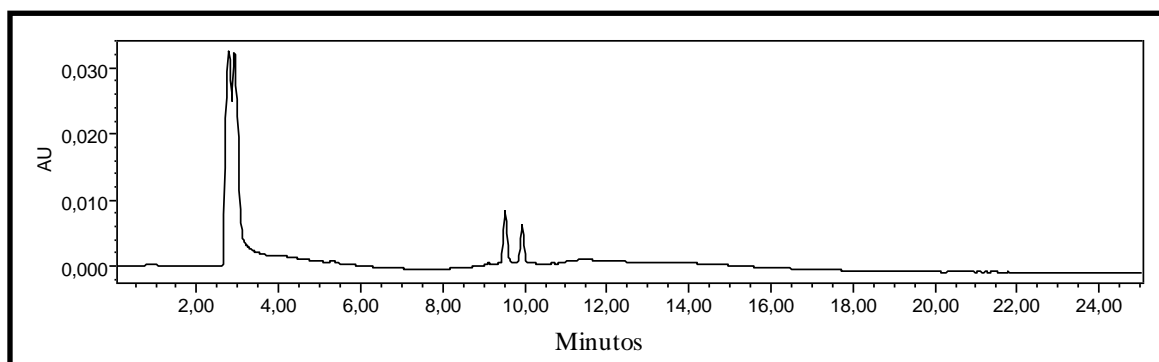
Com os resultados apresentados nas **Tabelas IV.10 e IV.11** pode-se notar, como também aconteceu com o cartucho C<sub>18</sub> Varian Bond Elut, que a NDELA é eluida já na etapa de percolação do extrato da amostra no cartucho. Por outro lado, para NDMA e NMOR ainda seria necessário mudança na polaridade do solvente de eluição, o que poderia ocasionar também um aumento da quantidade de interferentes que seriam eluidos juntamente com essas N-nitrosaminas. Dessa

forma, optou-se por escolher o cartucho C18 Varian Bond Elut com eluição dos analitos utilizando H<sub>2</sub>O/ACN 95:5 v/v.

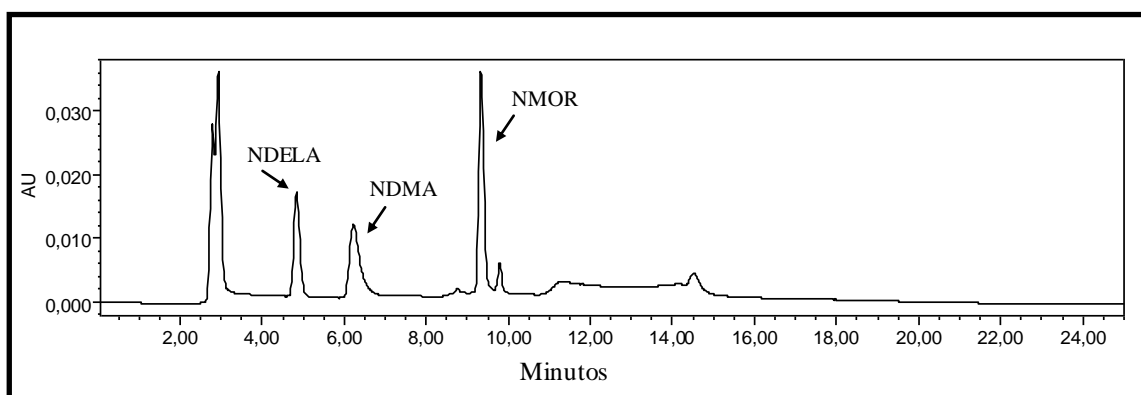
No cartucho HLB-OASIS também se obteve uma recuperação da NDELA maior que 100%, o que, além de indicar a co-eluição de interferentes, poderia estar havendo formação de NDELA durante o preparo de amostras. Diante disso, foi proposto um novo procedimento de preparo de amostra com as condições já otimizadas para a eluição dos analitos e adição de ácido ascórbico como inibidor de nitrosação. Este procedimento está descrito no item IV.3.4.1.2 e foi utilizado para os demais estudos.

#### IV.4.1.4 - Curva analítica na matriz

Utilizando o procedimento descrito em IV.3.4.1.2 foram construídas curvas analíticas na matriz xampu com os seguintes níveis de fortificação, 1,0; 2,5; 5,0; 10 e 15  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Nas **Figuras IV.12 e IV.13** são apresentados os cromatogramas para o branco de uma amostra de xampu e a amostra fortificada em 10,0  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente.

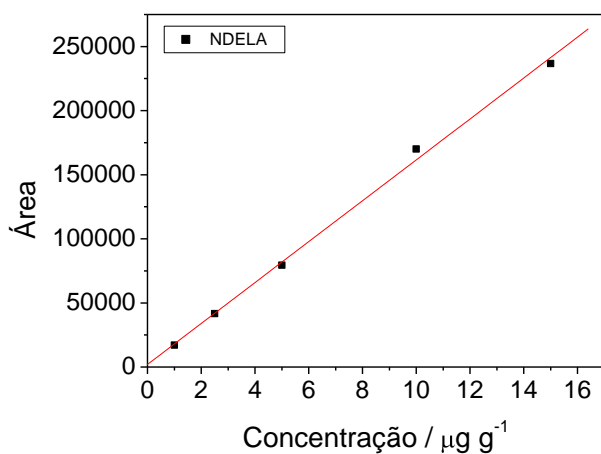


**Figura IV.12** - Cromatograma obtido para amostra de xampu (branco), percolado em cartucho Bond Elut C18 e eluído com 5 mL de H<sub>2</sub>O/ACN 95:5 v/v. Coluna C18 XBridge™: Fase móvel ACN:H<sub>2</sub>O. Eluição por gradiente (**Tabela IV.1**). Volume de injeção 50  $\mu\text{L}$  e vazão de 1  $\text{mL min}^{-1}$ . Detector: DAD,  $\lambda = 240 \text{ nm}$ .

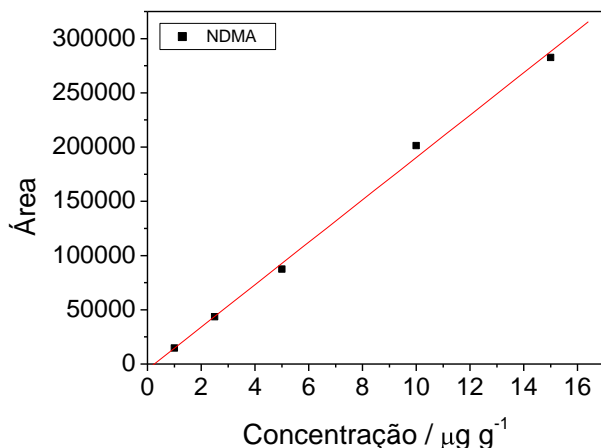


**Figura IV.13** - Cromatograma obtido para amostra de xampu fortificada com NDELA, NDMA e NMOR num nível de  $10,0 \mu\text{g g}^{-1}$ , percolado em cartucho Bond Elut C18 e eluído com 5 mL de  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  95:5 v/v. Coluna C18 XBridge™: Fase móvel:  $\text{ACN}:\text{H}_2\text{O}$ . Eluição por gradiente (**Tabela IV.1**). Volume de injeção  $50 \mu\text{L}$  e vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Detector: DAD,  $\lambda = 240 \text{ nm}$ .

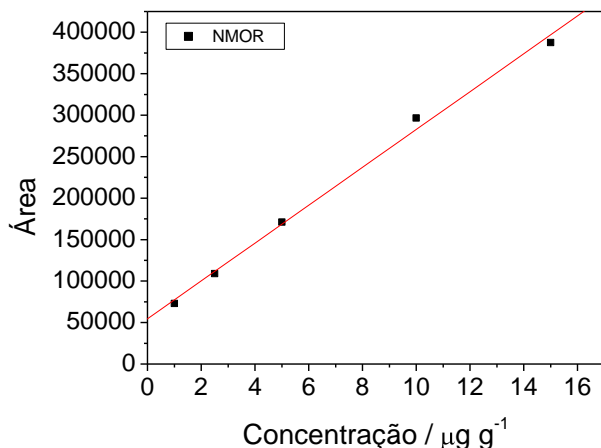
As curvas analíticas na matriz estão apresentadas nas **Figuras IV.14 - 16** e os parâmetros obtidos se encontram na **Tabela IV.12**.



**Figura IV.14** - Curva analítica na matriz para N-nitrosodietanolamina no intervalo de fortificação de 1 a  $15 \mu\text{g g}^{-1}$ . Coluna C18 XBridge™. Fase móvel,  $\text{ACN}:\text{H}_2\text{O}$ . Eluição por gradiente (**Tabela IV.1**). Volume de injeção  $50 \mu\text{L}$  e vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Detector: DAD,  $\lambda = 240 \text{ nm}$ .



**Figura IV.15** - Curva analítica na matriz para N-nitrosodimetilamina no intervalo de fortificação de 1 a 15  $\mu\text{g g}^{-1}$  Coluna C18 XBridge™. Fase móvel, ACN:H<sub>2</sub>O. Eluição por gradiente (**Tabela IV.1**). Volume de injeção 50  $\mu\text{L}$  e vazão de 1  $\text{mL min}^{-1}$ . Detector: DAD,  $\lambda = 240 \text{ nm}$ .



**Figura IV.16** - Curva analítica na matriz para N-nitrosomorfolina no intervalo de fortificação de 1 a 15  $\mu\text{g g}^{-1}$  utilizando Coluna C18 XBridge™. Fase móvel, ACN:H<sub>2</sub>O. Eluição por gradiente (**Tabela IV.1**). Volume de injeção 50  $\mu\text{L}$  e vazão de 1  $\text{mL min}^{-1}$ . Detector: DAD,  $\lambda = 240 \text{ nm}$ .

É possível verificar que a curva para a NMOR não passa pela origem, o que pode ser explicado pela presença de um interferente próximo ao tempo de retenção do analito. Cabe destacar, que o objetivo neste ponto do trabalho era apenas verificar se existe uma relação linear entre a área e concentração da NA.

**Tabela IV.12** – Parâmetros obtidos das curvas analíticas na matriz para as N-nitrosaminas utilizando HPLC-DAD

| Parâmetros                            | NDELA      | NDMA       | NMOR       |
|---------------------------------------|------------|------------|------------|
| Faixa Linear ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | 1,0 a 15,0 | 1,0 a 15,0 | 0,5 a 15,0 |
| Linearidade                           | 0,998      | 0,997      | 0,998      |
| Sensibilidade ( $\times 10^3$ )       |            |            |            |
| uA*/ $\mu\text{g g}^{-1}$             | 15,96      | 19,54      | 22,82      |
| LOD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )          | 0,3        | 0,3        | 0,2        |
| LOQ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )          | 1,0        | 1,0        | 0,5        |

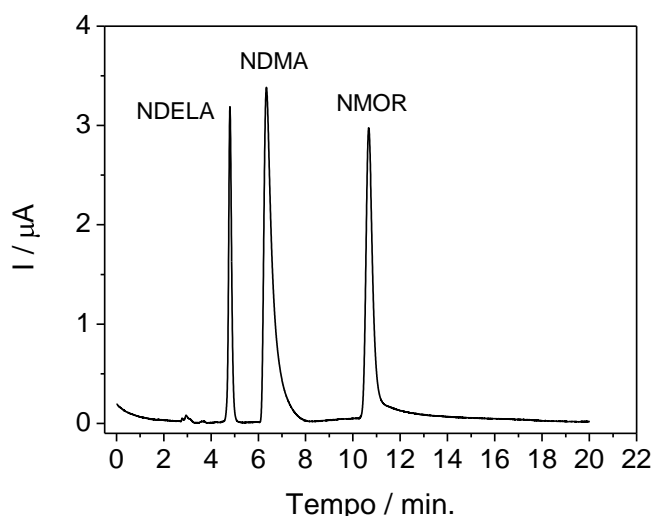
(\*)uA: unidade de área. LOD: limite de detecção do método. LOQ: limite de quantificação do método.

Os limites de quantificação e detecção foram estimados a partir de uma razão sinal-ruído de 10 e 3, respectivamente. A **Tabela IV.12** apresenta um limite de quantificação de  $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$  para NDELA e NDMA e de  $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$  para NMOR. Se considerarmos que estes compostos estejam presentes nessas matrizes geralmente em níveis menores que  $1 \mu\text{g g}^{-1}$ , conclui-se que com esse preparo de amostras e usando HPLC-DAD na quantificação não é possível alcançar a seletividade e detectabilidade requerida. Foi então avaliado o desempenho do método usando a cromatografia líquida associada ao detector eletroquímico.

#### IV.4.2 - Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector eletroquímico (HPLC-ED) – Célula *wall-jet*

A célula eletroquímica do tipo *wall-jet*, contendo como eletrodo de trabalho o eletrodo de diamante dopado com boro, desenvolvida no laboratório (célula apresentada no capítulo III) foi acoplada a um sistema de HPLC e controlada pelo potenciostato. Inicialmente foram avaliados parâmetros como: potencial aplicado e vazão da fase móvel, a fim de se obter um melhor valor de corrente, ou seja, sensibilidade. A separação das NA foi realizada na coluna XBridge™. A separação

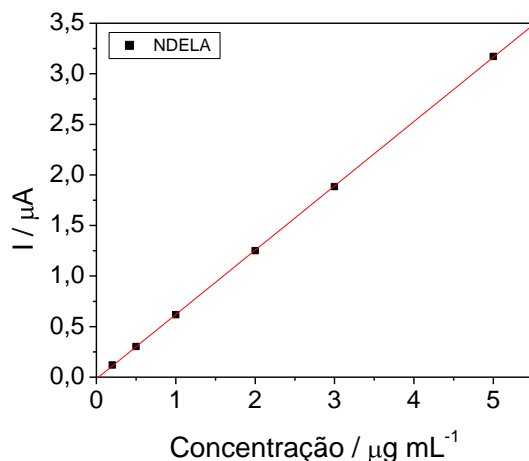
foi realizada em uma condição isocrática, com fase móvel de fosfato de sódio 0,10 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0. Cabe destacar que o detector amperométrico não é adequado para ser usado com gradientes de eluição e o tampão na fase móvel é requerido para promover a condutividade do meio. Os potenciais para oxidação da NA avaliados foram 1,7; 1,8; 1,9; 2,0 e 2,1 V vs Pt, sendo que o melhor compromisso entre intensidade de corrente obtida e ruído na linha de base foi com o potencial de 2,0 V vs Pt. Fixado o melhor potencial para detecção eletroquímica foi avaliada a vazão da fase móvel, sendo que uma vazão de 1 mL min<sup>-1</sup> foi adequada para a separação das NA. Desse modo, o potencial aplicado no detector amperométrico foi de 2,0 V vs Pt e a vazão da fase móvel foi de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. A **Figura IV.17** apresenta um cromatograma da separação da NDELA, NDMA e NMOR com detecção eletroquímica sob eletrodo de diamante dopado com boro.



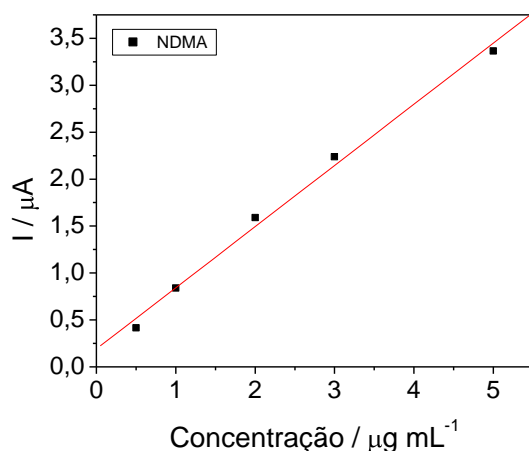
**Figura IV.17** – Cromatograma obtido para NDELA ( $t_R = 4,79$ ), NDMA ( $t_R = 6,34$ ) e NMOR ( $t_R = 10,66$ ) na concentração de 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , utilizando a célula *wall-jet*. Coluna C18 XBridge™ Fase móvel fosfato de sódio 0,10 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0; com vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 50  $\mu\text{L}$ . Potencial: 2,0 V vs Pt.

#### IV.4.2.1 - Curva analítica

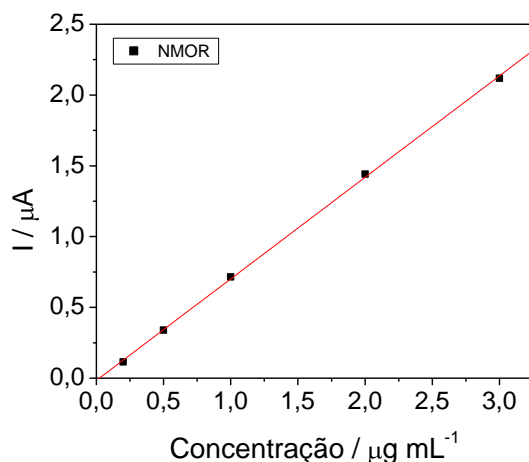
Após a otimização das melhores condições para detecção eletroquímica foram construídas curvas analíticas no solvente (**Figuras IV.18-20**). Os parâmetros das curvas estão apresentados na **Tabela IV.13**.



**Figura IV.18** - Curva analítica para N-nitrosodietanolamina no intervalo de 0,2 a 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  utilizando detecção eletroquímica (célula *wall-jet*). Fase móvel fosfato de sódio 0,10 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0; com vazão de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$  e volume de injeção de 50  $\mu\text{L}$ . Potencial: 2,0 V vs Pt.



**Figura IV.19** - Curva analítica para N-nitrosodimetilamina no intervalo de 0,5 a 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  utilizando detecção eletroquímica (célula *wall-jet*). Fase móvel fosfato de sódio 0,10 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0; com vazão de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$  e volume de injeção de 50  $\mu\text{L}$ . Potencial: 2,0 V vs Pt.



**Figura IV.20** - Curva analítica para N-nitrosomorfolina no intervalo de 0,2 a 3,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  utilizando detecção eletroquímica (célula *wall-jet*). Fase móvel fosfato de sódio 0,10 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0; com vazão de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$  e volume de injeção de 50  $\mu\text{L}$ . Potencial: 2,0 V vs Pt.



**Tabela IV.13.**– Parâmetros obtidos das curvas analíticas para as N-nitrosaminas utilizando HPLC-ED (célula *wall-jet*)

| Parâmetros                                      | NDELA     | NDMA      | NMOR      |
|---|-----------|-----------|-----------|
| Faixa Linear ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )          | 0,2 a 5,0 | 0,7 a 5,0 | 0,2 a 3,0 |
| Linearidade                                     | 0,9999    | 0,9967    | 0,9998    |
| Sensibilidade $\mu\text{A}/\mu\text{g mL}^{-1}$ | 0,63      | 0,65      | 0,72      |
| LDI* ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )                  | 0,05      | 0,2       | 0,05      |

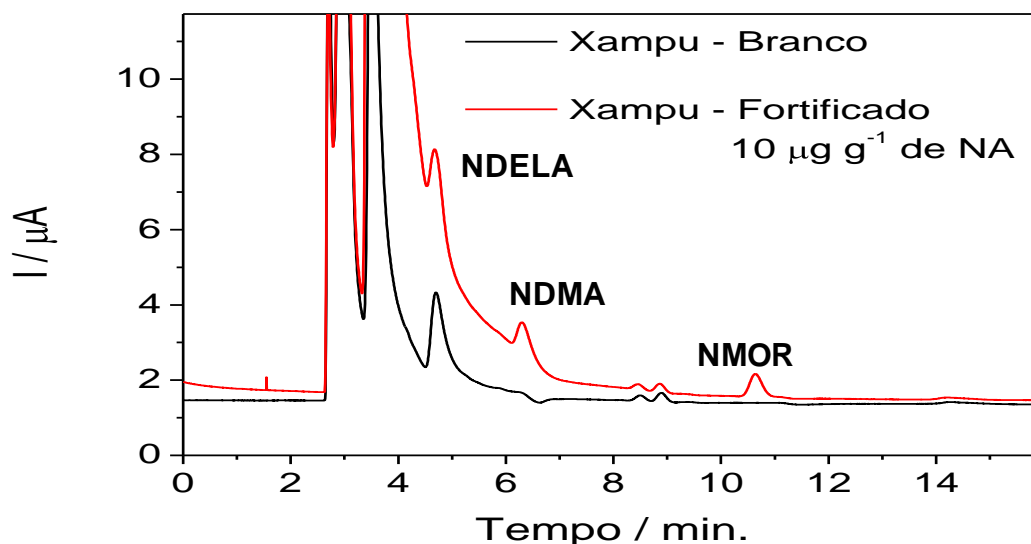
(\*) LDI: limite de detecção do instrumento.

O limite de detecção do instrumento foi estimado pela razão sinal-ruído igual a 3 e representa a menor concentração de NA que o equipamento consegue detectar.

#### IV.4.2.1 - Curva analítica na matriz

Estimada a faixa linear do método foram então construídas as curvas analíticas na matriz com um nível de fortificação no intervalo de  $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$  a  $15 \mu\text{g g}^{-1}$ . O procedimento utilizado para o preparo de amostra foi o descrito no item IV.3.4.1.2.

Cromatogramas característicos para as amostras branco e amostra fortificada estão apresentados na **Figura IV.21**.



**Figura IV.21**– Cromatograma obtido para amostra branco e amostra fortificada com  $10 \mu\text{g g}^{-1}$  de NDELA, NDMA e NMOR, utilizando a célula *wall-jet*. Coluna C18 XBridge™. Fase móvel fosfato de sódio  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0; com vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  e volume de injeção de  $50 \mu\text{L}$ . Potencial:  $2,0 \text{ V vs Pt}$ .

Os valores de faixa linear, linearidade e sensibilidade estão apresentados na **Tabela IV.14**.

Com os dados obtidos pode-se observar que a curva analítica obtida na matriz não apresentou valores de linearidade satisfatórios, no intervalo estudado. Os coeficientes de regressão linear foram menores que 0,99. Além disso, para a NDELA não foi possível a avaliação destes parâmetros, devido à interferência da matriz. De fato, o nível de interferência depende do sistema de detecção.

Um ponto a considerar é que o primeiro nível de fortificação ainda se encontra numa concentração muito alta, para compostos presentes nestas matrizes como contaminantes, e esse nível de fortificação não pode ser diminuído devido à interferência da matriz. Este procedimento também foi avaliado aumentando-se a quantidade de amostra de 1,0 para 2,0 g. Porém com o aumento da massa da amostra houve também um incremento dos interferentes.

**Tabela IV.14** – Parâmetros obtidos das curvas analíticas na matriz, para as N-nitrosaminas, utilizando HPLC-ED (célula *wall-jet*)

| Parâmetros                                      | NDELA | NDMA       | NMOR       |
|---|-------|------------|------------|
| Faixa Linear do método ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | -     | 3,0 a 15,0 | 1,0 a 15,0 |
| Linearidade                                     | -     | 0,9659     | 0,9857     |
| Sensibilidade $\mu\text{A}/\mu\text{g g}^{-1}$  | -     | 0,055      | 0,081      |
| LOD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )                    | -     | 1          | 0,3        |
| LOQ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )                    | -     | 3          | 1          |

LOD: limite de detecção do método; LOQ: limite de quantificação do método.

Diante dos resultados, fica evidente a inviabilidade desta técnica para quantificação de N-nitrosaminas nas amostras de xampu empregando o preparo de amostra descrito em IV.3.4.1.2. Ainda, cabe destacar que o sistema leva um tempo considerável para estabilizar, em algumas situações em torno de algumas horas. O grande problema no uso de detectores amperométricos com eletrodos sólidos é a passivação da superfície considerando a grande quantidade de surfactantes presentes nas amostras de xampu.

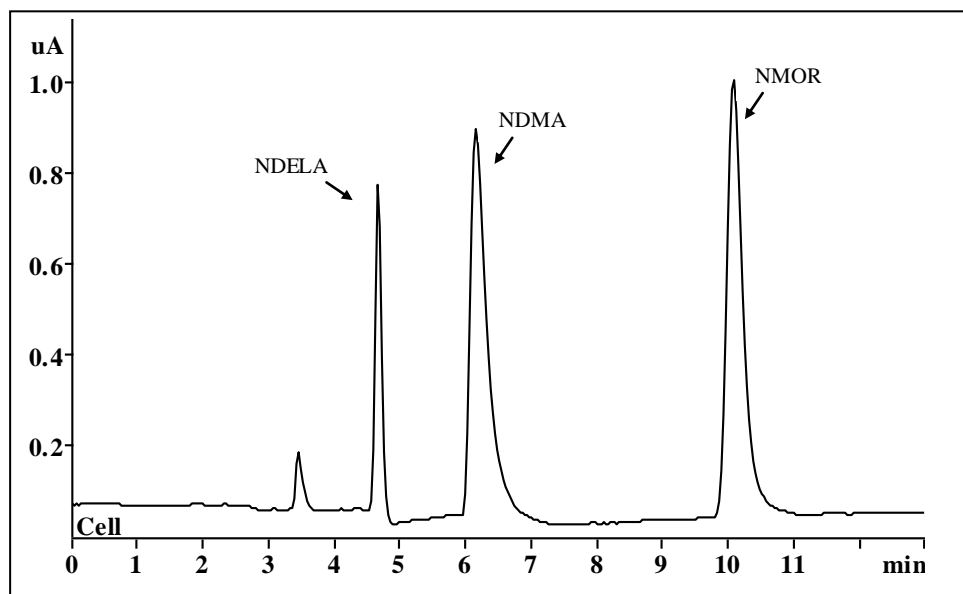
#### IV.4.3 - Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector eletroquímico (HPLC-ED) – Célula *thin-layer*

Outro sistema, com detecção eletroquímica, utilizado neste trabalho, foi o sistema da Metrohm® (Advanced Bioscan) composto por uma célula amperométrica *thin-layer* com eletrodos de aço e platina como eletrodo de referência e auxiliar, respectivamente. Nesta célula foi acoplado como eletrodo de trabalho um eletrodo de diamante dopado com boro DDB 8000 ppm (área de 78 mm<sup>2</sup>).

Os testes realizados para otimização das condições cromatográficas foram os mesmos utilizados para o detector eletroquímico do tipo *wall-jet* e as condições selecionadas também foram as mesmas, potencial aplicado de 2,0 V vs aço e

vazão da fase móvel  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ . Uma das desvantagens desta célula comercial é que o potencial máximo que pode ser aplicado é de  $-2 \text{ V vs aço}$ . Sendo assim, para fazer a limpeza do eletrodo em um potencial de  $-3 \text{ V vs aço}$  foi necessário desmontar a célula e usar o potenciostato/galvanostato.

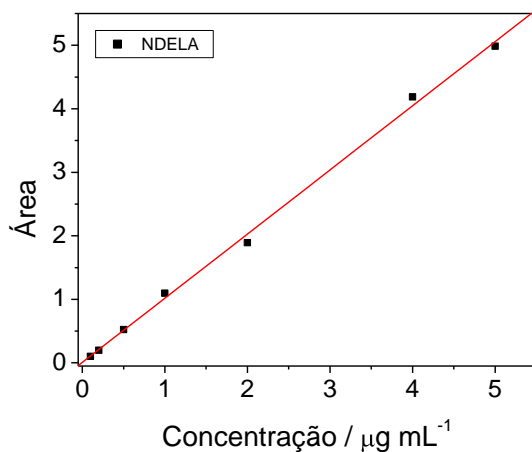
Um cromatograma característico para a separação da NDELA, NDMA e NMOR com detecção eletroquímica está apresentado na **Figura IV.22**.



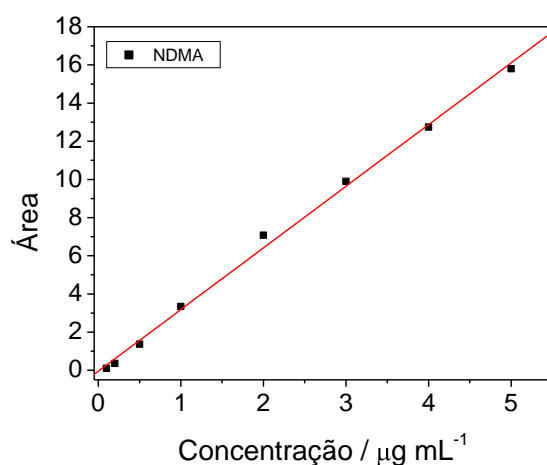
**Figura IV.22** - Cromatograma obtido para NDELA ( $t_R = 4,67$ ), NDMA ( $t_R = 6,16$ ) e NMOR ( $t_R = 10,08$ ) na concentração de  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , utilizando detecção eletroquímica (célula *thin-layer*). Coluna C18 XBridge™. Fase móvel fosfato de sódio  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0; com vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  e volume de injeção de  $20 \mu\text{L}$ . Potencial:  $2,0 \text{ V vs aço}$ .

#### IV.4.3.1 - Curva analítica

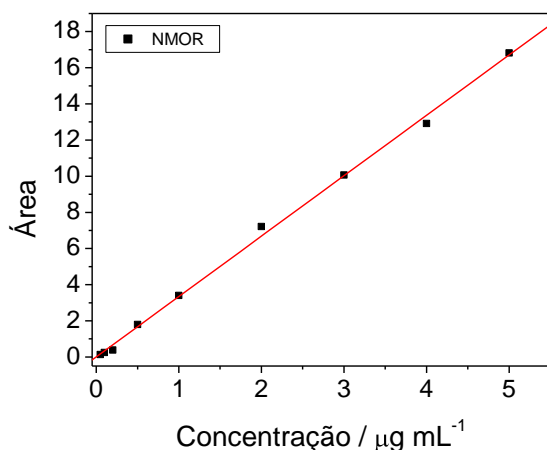
Após otimização dos parâmetros, foram construídas as curvas analíticas (**Figuras IV.23-25**) e os dados obtidos encontram-se na **Tabela IV.15**.



**Figura IV.23** - Curva analítica para N-nitrosodietanolamina no intervalo de 0,2 a 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  utilizando detecção eletroquímica (célula *thin-layer*) Fase móvel fosfato de sódio 0,10 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0; com vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . Potencial: 2,0 V vs aço.



**Figura IV.24** - Curva analítica para N-nitrosodimetilamina no intervalo de 0,2 a 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  utilizando detecção eletroquímica (célula *thin-layer*) Fase móvel fosfato de sódio 0,10 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0; com vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . Potencial: 2,0 V vs aço.



**Figura IV.25** - Curva analítica para N-nitrosomorfolina no intervalo de 0,2 a 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  utilizando detecção eletroquímica (célula *thin-layer*) Fase móvel fosfato de sódio 0,10 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0; com vazão de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$  e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . Potencial: 2,0 V vs aço.

**Tabela IV.15** – Parâmetros obtidos das curvas analíticas para as N-nitrosaminas utilizando HPLC-ED (célula *thin-layer*)

| Parâmetros                                      | NDELA     | NDMA      | NMOR      |
|---|-----------|-----------|-----------|
| Faixa Linear ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )          | 0,3 a 5,0 | 0,3 a 5,0 | 0,2 a 5,0 |
| Linearidade                                     | 0,998     | 0,998     | 0,999     |
| Sensibilidade $\mu\text{A}/\mu\text{g mL}^{-1}$ | 1,01      | 3,23      | 3,34      |
| LDI* ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )                  | 0,1       | 0,1       | 0,05      |

(\*) LDI: limite de detecção do instrumento.

#### IV.4.3.2 - Curva analítica na matriz

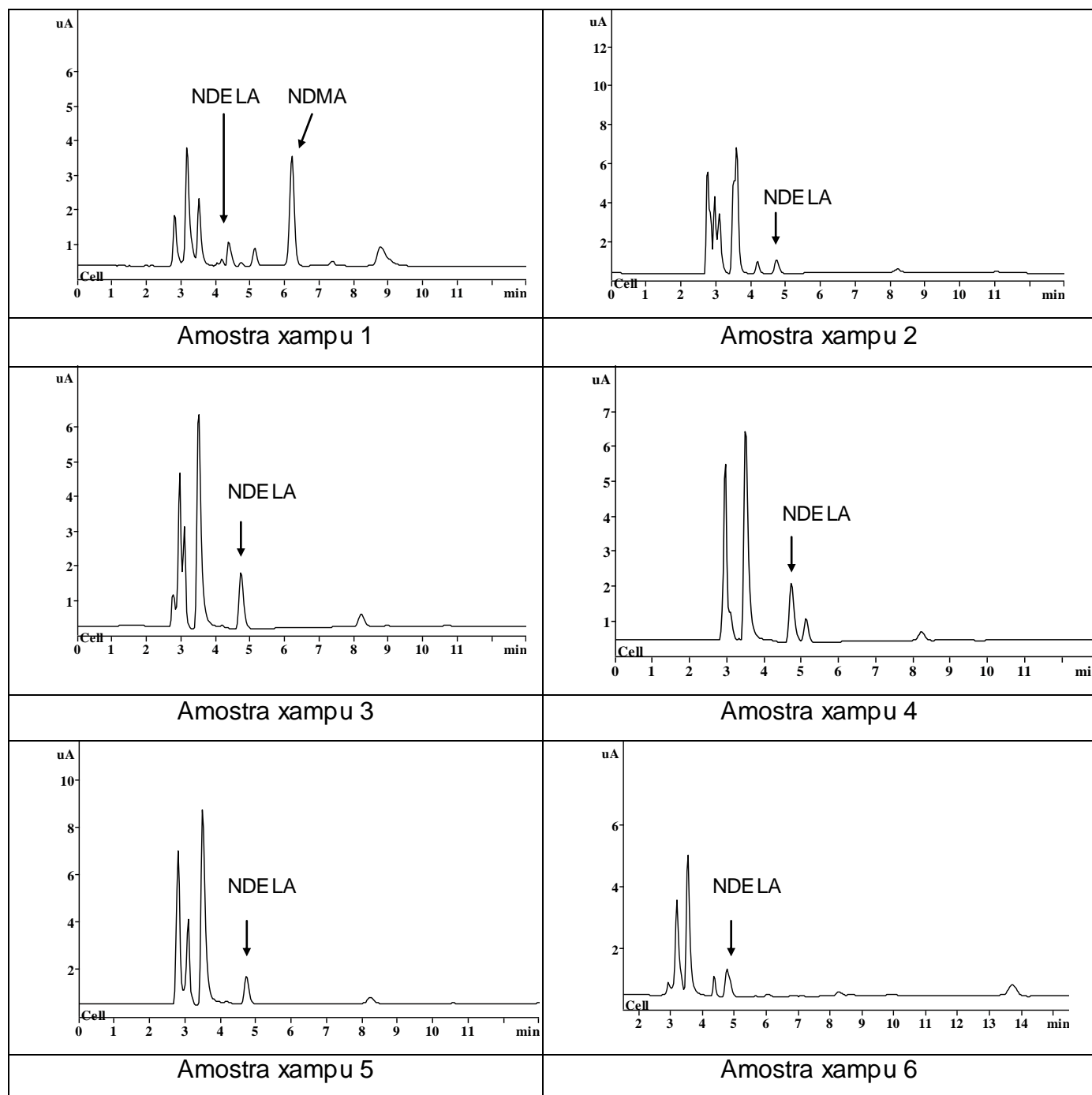
Como o limite de detecção do instrumento foi satisfatório, 0,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e pensando-se em buscar seletividade para as NA em estudo foi avaliado a linearidade das curvas na matriz. Neste estudo apenas 3 níveis de fortificação foram usados. O procedimento de preparo de amostra usado foi descrito em IV.3.4.1.2.

Foi possível verificar que houve linearidade entre o intervalo de concentração de 5 a 15  $\mu\text{g g}^{-1}$  para a NDMA e NMOR ( $r > 0,99$ ). A sensibilidade foi de 0,28 e 0,33  $\mu\text{A}/\mu\text{g g}^{-1}$ , para a NDMA e NMOR, respectivamente. Não foi possível avaliar a NDELA pela falta de seletividade, fato também já verificado anteriormente com a célula *wall-jet*. O LOQ foi estimado em 5  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

Uma vez que o LOQ seria muito elevado para o propósito deste método, foi avaliado também, com este sistema de detecção, um preparo de amostra usando a dispersão da matriz em fase sólida, conforme procedimento descrito em IV.3.4.1.1 Como sorvente foi empregado florisil. Esse preparo de amostras permitiria uma concentração das NA e, assim, seria possível alcançar um LOQ de valor menor.

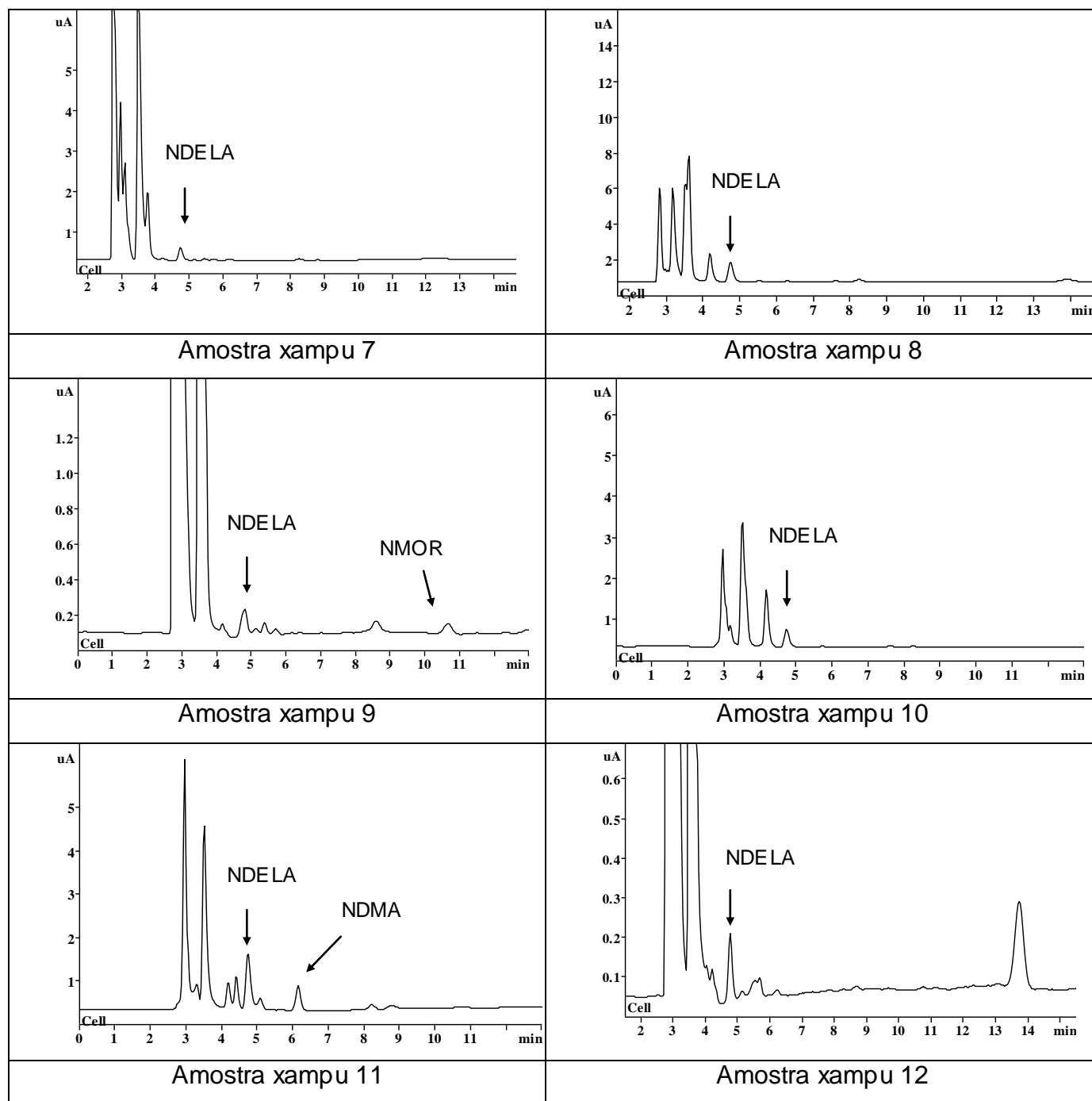
No entanto, usando este preparo de amostras, o LOQ estimado foi de  $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$ , ou seja, esse detector também não trouxe vantagens em relação à detectabilidade frente ao detector *wall-jet* anteriormente empregado. Também foi verificado que o método não apresentaria seletividade adequada nestas condições e que o preparo de amostras teria que ser reavaliado para permitir o uso deste sistema de detecção. Neste sentido, foi importante avaliar o número de interferentes presentes nas diferentes formulações. Cabe destacar, que uma ampla variedade de matérias prima são empregadas para fabricação de xampu.

Para verificar quais seriam os interferentes em potencial, foram analisadas 12 amostras de xampu de fabricantes diferentes, usando o procedimento descrito em IV.3.4.1.2. Os cromatogramas estão apresentados nas **Figuras IV.26 e IV.27**.



**Figura IV.26** - Cromatogramas obtidos para amostras de xampu 1 a 6, utilizando detecção eletroquímica (célula *thin-layer*) Coluna C18 XBridge™. Fase móvel fosfato de sódio 0,10 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0; com vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 20 µL. Potencial: 2,0 V vs aço.





**Figura IV.27** - Cromatogramas obtidos para amostras de xampu 7 a 12, utilizando detecção eletroquímica (célula *thin-layer*) Coluna C18 XBridge™. Fase móvel fosfato de sódio 0,10 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0; com vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 20 µL. Potencial: 2,0 V vs aço.

Pelos cromatogramas obtidos há evidência da presença de NDELA em todas as amostras analisadas, NDMA em duas amostras e NMOR em uma das 12 amostras analisadas (**Tabela IV.16**). Porém, como esta técnica não se mostrou seletiva, em particular para a NDELA e o limite de quantificação não foi satisfatório, essas amostras teriam que ser analisadas com um detector mais seletivo, como o espectrômetro de massas num específico intervalo de massas. Após esses estudos fica evidente que o detector eletroquímico, usando o DDB, não tem a seletividade requerida e que métodos confirmatórios são indispensáveis.

**Tabela IV.16** – Resultados qualitativos da presença de N-nitrosaminas nas amostras de xampu.

| Amostra | NDELA | NDMA | NMOR |
|---------|-------|------|------|
| 1       | +     | +    | -    |
| 2       | +     | -    | -    |
| 3       | +     | -    | -    |
| 4       | +     | -    | -    |
| 5       | +     | -    | -    |
| 6       | +     | +    | -    |
| 7       | +     | -    | -    |
| 8       | +     | -    | -    |
| 9       | +     | -    | +    |
| 10      | +     | -    | -    |
| 11      | +     | +    | -    |
| 12      | +     | -    | -    |

#### **IV.4.4 - Desenvolvimento de método para determinação de N-nitrosaminas em amostras de xampu por cromatografia líquida associada a espectrometria de massas em *tandem***

##### **IV.4.4.1 - Otimização dos parâmetros para LC-MS/MS QToF**

Para os testes iniciais foram utilizados os parâmetros sugeridos por Schothorst e Sommers (2005). A partir dessas condições foram otimizados os seguintes parâmetros do espectrômetro de massas: polaridade ( $ESI^+$ ), voltagem do capilar (3500 V), cone de amostragem (20 V), cone de extração (3 V), temperatura de dessolvatação (350 °C), temperatura na fonte (120 °C), energia de ionização (2 V), energia de colisão (2 V). Estes parâmetros foram otimizados isoladamente para cada NA, na concentração de 2,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , infundidas diretamente no espectrômetro de massa com auxílio de uma bomba seringa na vazão de 5  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Uma vez que se espera trabalhar com NDELA, NDMA, NMOR e NDEA em uma mesma análise optou-se por utilizar uma condição que fosse adequada para determinação simultânea dessas NA.

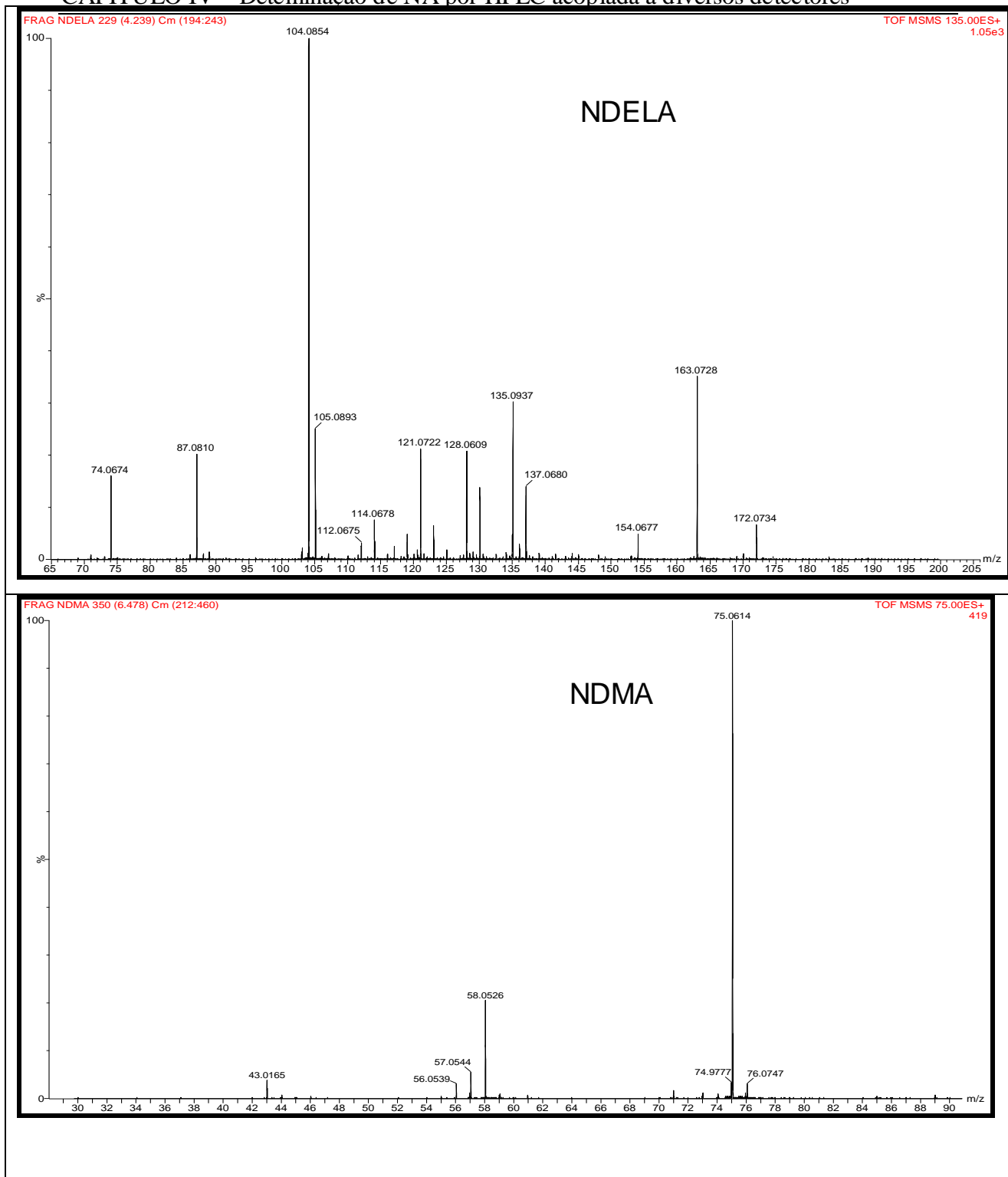
Nas **Figuras IV.28 e IV.29** estão apresentados os espectros de massas obtidos para NDELA, NDMA, NMOR e NDEA. Nessas condições foi possível obter uma quantidade satisfatória de íons produtos para identificação, além dos íons precursores.

Os íons de quantificação e identificação produzidos nas condições de ionização selecionada são discriminados na **Tabela IV.17**, bem como as respectivas razões  $m/z$  teóricas ( $m/z$  teor.) e as encontradas experimentalmente ( $m/z$  exp.). A característica de alta exatidão da razão  $m/z$  conferido à técnica aplicada na identificação das NA, bem como a quantidade de íons de identificação, contribuem para a característica de alta seletividade do método.

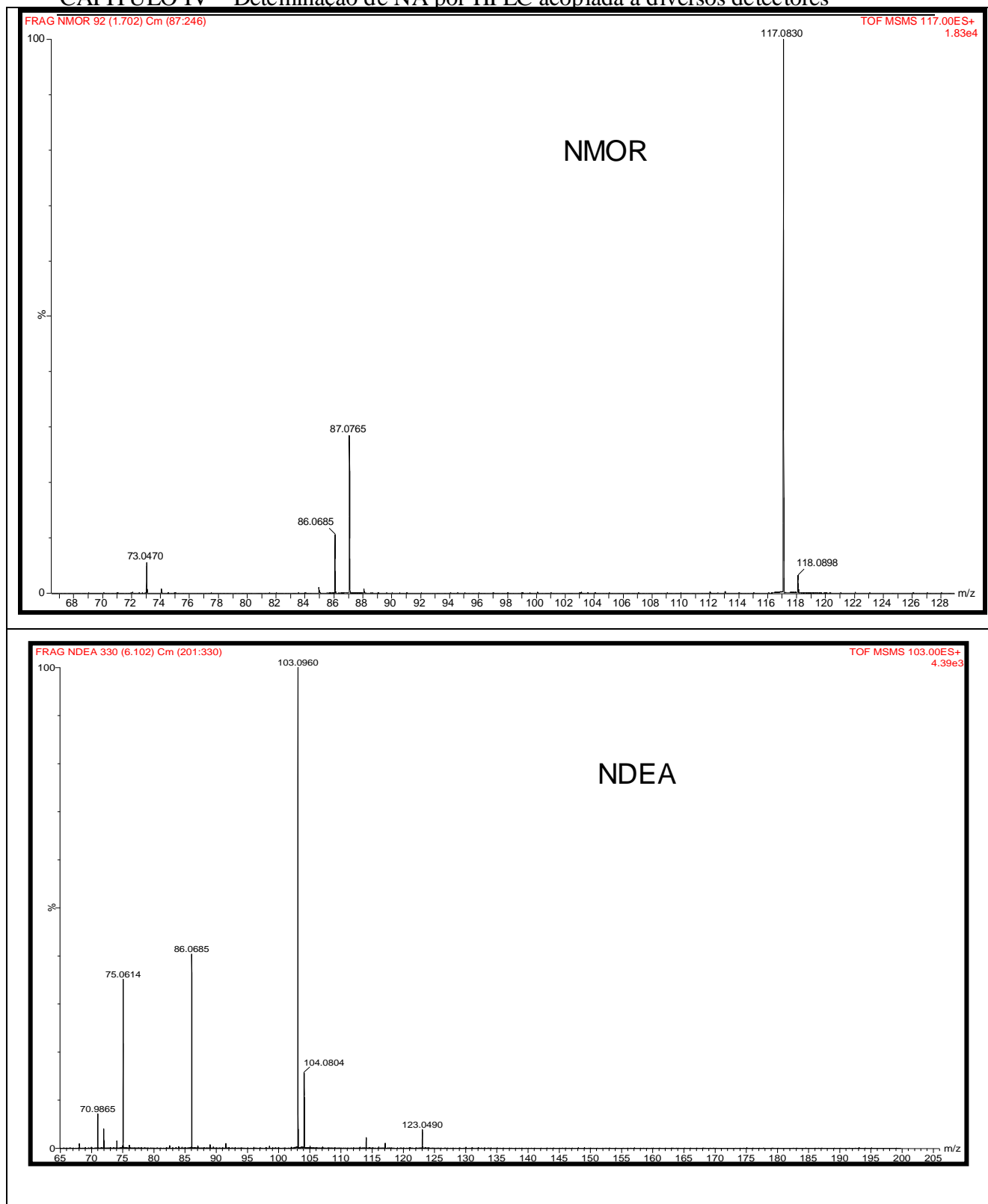
**Tabela IV.17** - Íons de quantificação e de identificação das NA e os respectivos erros de exatidão entre as razões m/z teóricas e experimentais

|                                       | <b>NDMA</b>  | <b>NMOR</b>    | <b>NDELA</b>      | <b>NDEA</b>     |
|---------------------------------------|--------------|----------------|-------------------|-----------------|
| <b>Fórmula molecular</b>              | $C_2H_6N_2O$ | $C_4H_8N_2O_2$ | $C_4H_{10}N_2O_3$ | $C_4H_{10}N_2O$ |
| <b>Ion de Quantificação</b>           |              |                |                   |                 |
| <b>M<sup>+1</sup> (m/z) (teórico)</b> | 75,0558      | 117,0664       | 135,0770          | 103,0871        |
| <b>M<sup>+1</sup> (m/z) (exp.*)</b>   | 75,0614      | 117,0830       | 135,0937          | 103,0960        |
| <b>Ions de Identificação</b>          |              |                |                   |                 |
| <b>Fragmento (I)</b>                  | 58,0526      | 87,0765        | 104,0854          | 86,0685         |
| <b>Fragmento (II)</b>                 |              | 73,0470        | 74,0674           | 75,0614         |

\*M<sup>+1</sup> (m/z) experimental



**Figura IV.28** - Espectro de massas de fragmentação para NDELA e NDMA, voltagem do capilar: 3500 V; voltagem do cone da amostra: 20 V; voltagem do cone de extração: 3 V; temperatura de dessolvatação 350 °C; temperatura da fonte de ionização: 120 °C; energia de ionização 2 V e energia de colisão 5 V.



**Figura IV.29** - Espectro de massas de fragmentação para NMOR e NDEA, voltagem do capilar: 3500 V; voltagem do cone da amostra: 20 V; voltagem do cone de extração: 3 V; temperatura de dessolvatação 350 °C; temperatura da fonte de ionização: 120 °C; energia de ionização 2 V e energia e colisão 5 V.

Otimizados os parâmetros para o espectrômetro de massas, foram avaliadas algumas condições para o uso do cromatógrafo líquido acoplado a este detector.

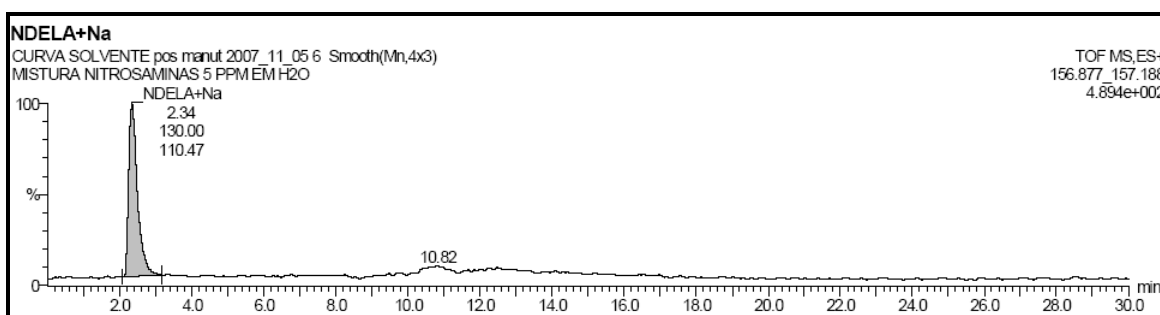
Para isso foram adicionados alguns modificadores na fase móvel a fim de facilitar a ionização dessas moléculas. Uma das possibilidades avaliadas foi a adição de 0,1% de ácido acético à fase móvel. Porém, foi observado que com adição deste ácido a separação das NA foi prejudicada na coluna cromatográfica. Este fato é decorrente da protonação das NA o que dimui a interação das moléculas com a fase estacionária apolar. Tentou-se então, utilizar acetato de amônio ( $\text{NH}_4\text{Ac}$ )  $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  na fase orgânica e na fase aquosa, em substituição ao ácido acético. Comparado com a fase móvel utilizada sem adição de  $\text{NH}_4\text{Ac}$ , foi verificado que, em termos de intensidade de sinal, o sistema se comportou melhor sem adição deste sal. Ainda assim, estudos realizados anteriormente evidenciaram uma melhor dessolvatação e, conseqüentemente, melhora na intensidade do sinal com a utilização de metanol no eluente orgânico em substituição à acetonitrila. Por esse motivo, este foi utilizada na fase orgânica.

Após otimizadas as condições do cromatógrafo líquido e do espectrômetro de massas, uma mistura das NA na concentração de  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi injetada no cromatógrafo e identificados os respectivos íons moleculares. Porém, pode-se observar que para NDELA a intensidade do sinal apresentado era inferior às demais NA. De acordo com alguns estudos realizados anteriormente onde se pode observar a formação de adutos de sódio nos íons moleculares, procurou-se observar se seria possível a formação de aduto de sódio com o íon molecular da NDELA. Foi então observado que juntamente com a  $m/z$  135 da NDELA foi identificado a possível formação de um aduto com  $m/z$  157 ( $134 + 23$  correspondente à adição de um íon Na). Para tentar forçar a formação de aduto durante as análises, foi adicionado à fase móvel  $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de acetato de sódio, porém, o sinal para todas as NA ficou prejudicado. Dessa forma, optou-se por quantificar a NDELA pelo seu aduto de sódio as demais NA pelos seus respectivos íons moleculares.

#### IV.4.4.2 - Curva analítica

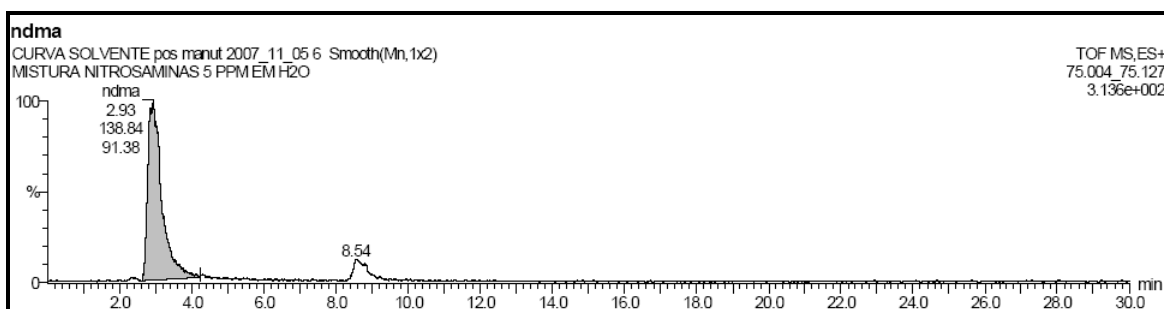
Otimizados todos os parâmetros para o sistema LC-MS/MS QToF foram construídas curvas analíticas no solvente no intervalo de concentração de 0,5 a 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Inicialmente, foram feitas curvas analíticas para NDELA, NDMA, NMOR e NDEA, para avaliar qual seria a melhor concentração de NDEA para ser utilizada como padrão interno. Foi então construída a curva analítica no solvente para NDELA, NDMA e NMOR no intervalo de concentração de 0,5 a 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e NDEA na concentração de 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Nas **Figuras IV.30, IV.31 e IV.32** são apresentados os cromatogramas para NDELA (aduto) e NDMA, na concentração de 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e NMOR 4,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

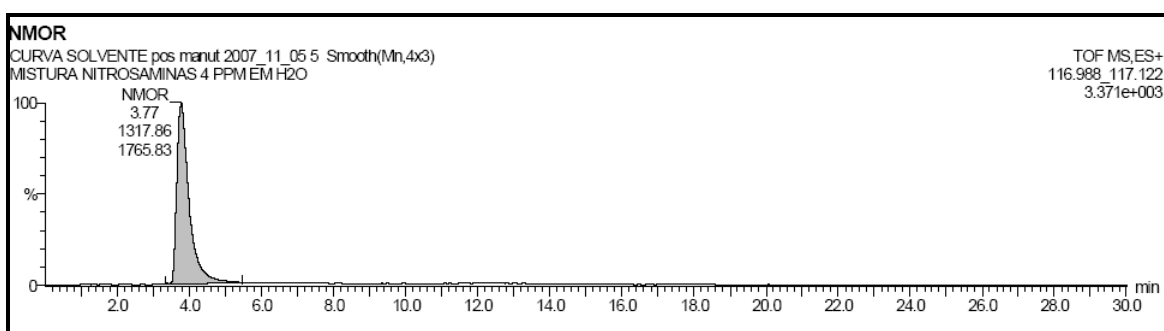


**Figura IV.30** – Cromatograma obtido para NDELA (aduto), na concentração de 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna: C18 XTerra™. Fase móvel H<sub>2</sub>O/ACN com eluição gradiente (**Tabela IV.2**) numa vazão de 0,25 mL min<sup>-1</sup>.



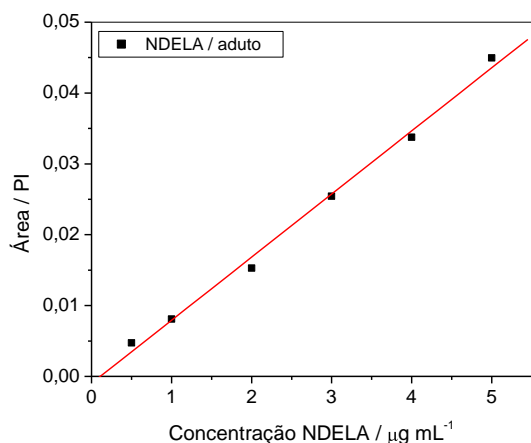


**Figura IV.31** – Cromatograma obtido para NDMA na concentração de  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna: C18 XTerra™. Fase móvel  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  com eluição gradiente (**Tabela IV.2**) numa vazão de  $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ .

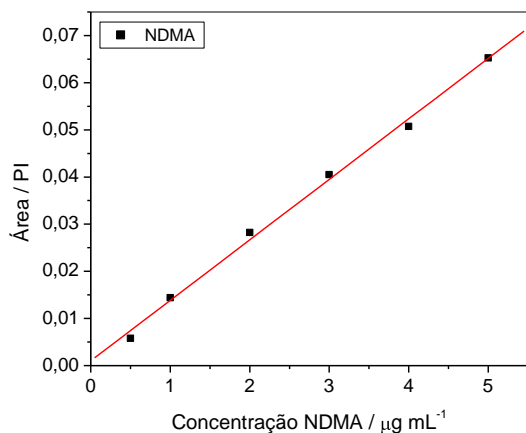


**Figura IV.32** – Cromatograma obtido para NMOR, na concentração de  $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna: C18 XTerra™. Fase móvel  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  com eluição gradiente (**Tabela IV.2**) numa vazão de  $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ .

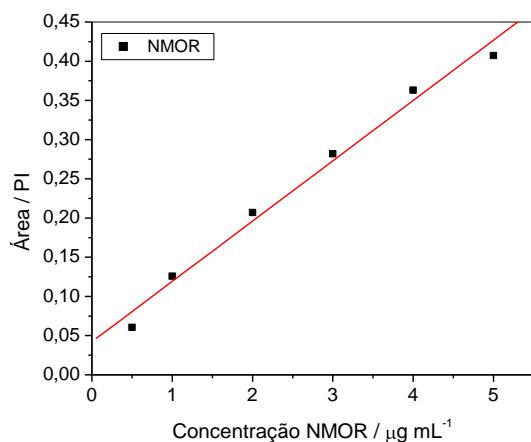
As curvas analíticas obtidas para a NDELA, NDMA e NMOR no solvente estão apresentadas nas **Figuras IV.33-35**, respectivamente.



**Figura IV.33** – Curva analítica obtida para o aduto da NDELA, no intervalo de concentração de  $0,5$  a  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna: C18 XTerra™. Fase móvel  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  com eluição gradiente (**Tabela IV.2**) e vazão de  $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ .



**Figura IV.34** – Curva analítica obtida para a NDMA, no intervalo de concentração de 0,5 a 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna: C18 XTerra™. Fase móvel  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  com eluição gradiente (Tabela IV.2) e vazão de 0,25  $\text{mL min}^{-1}$ .



**Figura IV.35** – Curva analítica obtida para a NMOR, no intervalo de concentração de 0,5 a 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna: C18 XTerra™. Fase móvel  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  com eluição gradiente (Tabela IV.2) e vazão de 0,25  $\text{mL min}^{-1}$ .

Os valores das figuras de mérito obtidos a partir das curvas analíticas (faixa linear, linearidade e sensibilidade) estão apresentados na **Tabela IV.18**.

**Tabela IV.18** – Parâmetros obtidos das curvas analíticas para as NA utilizando LC-MS/MS Q ToF

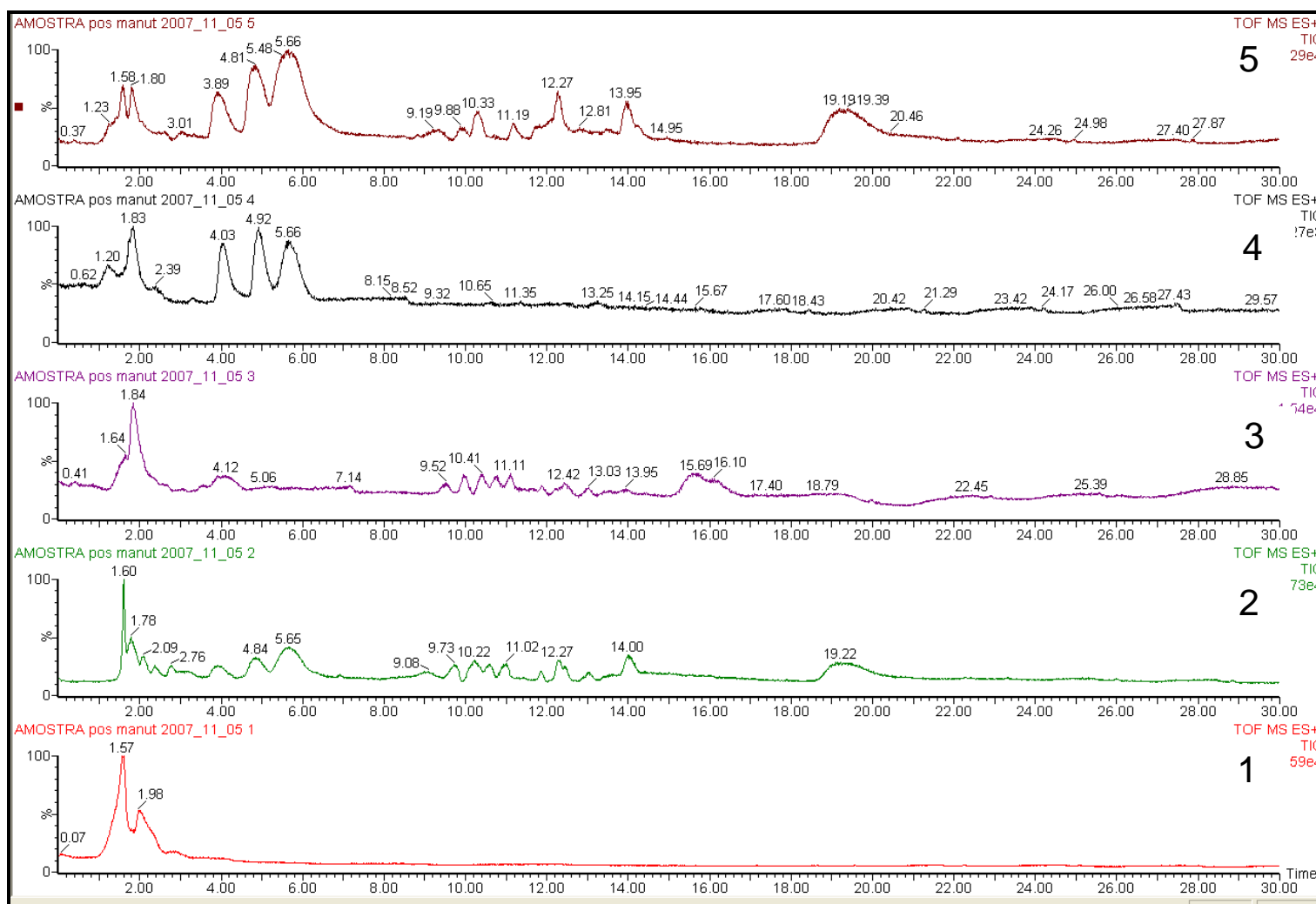
| Parâmetros  | NDELA <sub>aduto</sub> | NDMA      | NMOR      |
|---|------------------------|-----------|-----------|
| <b>Faixa Linear (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>          | 0,5 a 5,0              | 0,5 a 5,0 | 0,5 a 5,0 |
| <b>Linearidade</b>  | 0,998                  | 0,998     | 0,994     |
| <b>Sensibilidade <math>\text{uA}/\mu\text{g mL}^{-1}</math></b> | 0,0099                 | 0,013     | 0,077     |
| <b>LDI* (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>                  | 0,1                    | 0,1       | 0,1       |

uA: unidade de área, (\*) LDI: limite de detecção do instrumento.

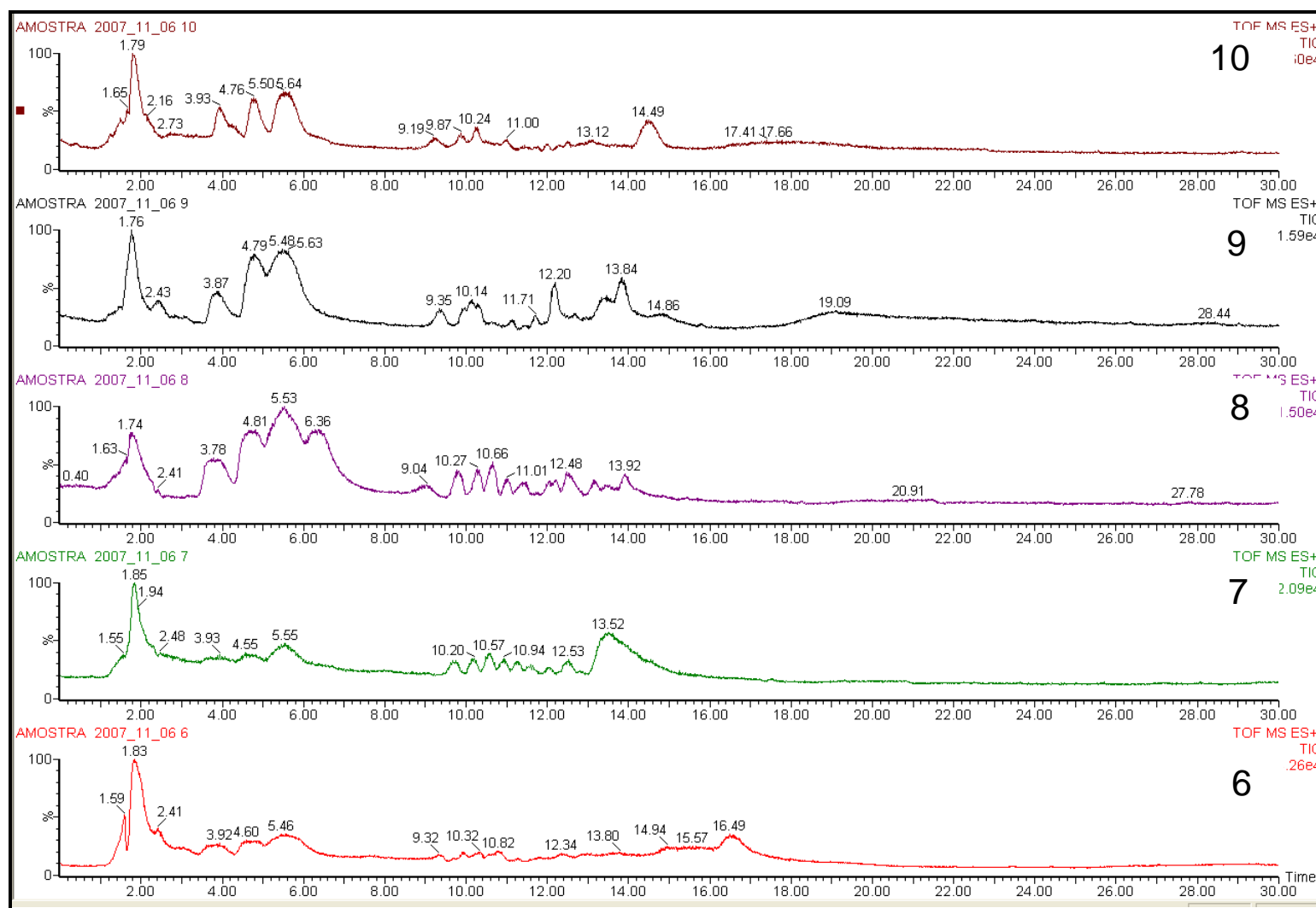
#### IV.4.4.3 - Preparo de amostras

Inicialmente para o preparo de amostras foi avaliada a técnica de extração em fase sólida (SPE) baseada no trabalho desenvolvido por Schothorst e Sommers (2005), com algumas modificações. O cartucho utilizado foi o octadecil (500 mg, Varian Bond Elut). A avaliação deste procedimento foi realizada mediante a análise de amostras branco (matriz sem adição de NA) e amostras branco fortificadas com NDELA, NDMA, NMOR e NDEA, visando inicialmente avaliar a eficiência de extração (avaliado pelo parâmetro de recuperação), assim como a presença de interferentes. Para tanto, quatorze amostras de xampus de fabricantes diferentes, adquiridos no comércio local em Campinas, SP, foram analisadas. Neste procedimento, 1,0 g de amostra foi pesado diretamente em tubo de ensaio e adicionado de 5,0 mL de água Milli-Q. Essa mistura foi levada a um banho de ultra-som por 10 min e depois passado pelo cartucho de SPE, previamente condicionado com 3 mL de MeOH e 3 mL de água. O extrato foi recolhido em um balão de 10 mL e logo em seguida foram percolados pelo cartucho mais 2 mL de ACN/H<sub>2</sub>O 50:50 v/v para eluição completa dos analitos de interesse que ainda ficaram retidos. Esse eluato foi recolhido no mesmo balão e o volume completado com água. Essa solução foi filtrada em filtro de membrana de 0,22 µm e analisada. Esse procedimento recomendado por Schothorst e Sommers (2005) tem a desvantagem de não permitir a concentração da NA e apenas reter possíveis interferentes no cartucho. Ainda, as NA que estavam contidas inicialmente em 1 mL da amostra foram diluídas para 10 mL após o preparo. Os autores recomendam diluir a amostra inicial para 19 mL, descartar os primeiros 5 mL e analisar o restante. Sendo assim, pela diluição da amostra, fica comprometido o limite de quantificação do método.

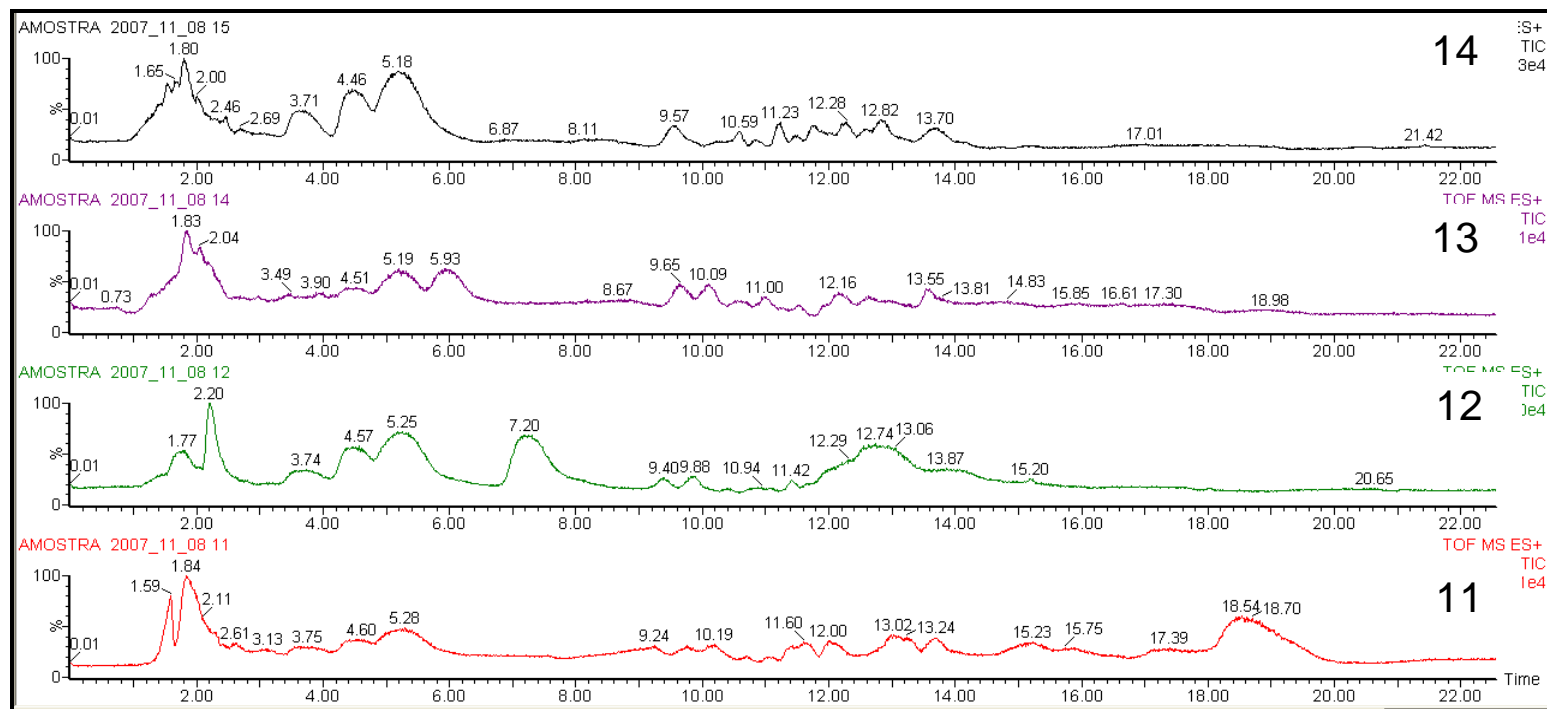
Os cromatogramas para as quatorze amostras analisadas são apresentados nas **Figuras IV.36 a IV.38**.



**Figura IV.36** – Cromatogramas com detecção por espectrometria de massas das amostras de xampus de 1 a 5. Voltagem do capilar: 3500 V; voltagem do cone da amostra: 20 V; voltagem do cone de extração: 3 V; temperatura de dessolvatação 350 °C; temperatura da fonte de ionização: 120 °C; energia de ionização 2 V e energia de colisão 5 V.



**Figura IV.37** – Cromatogramas com detecção por espectrometria de massas das amostras de xampus de 6 a 10. Voltagem do capilar: 3500 V; voltagem do cone da amostra: 20 V; voltagem do cone de extração: 3 V; temperatura de dessolvatação 350 °C; temperatura da fonte de ionização: 120 °C; energia de ionização 2 V e energia de colisão 5 V.



**Figura IV.38** – Cromatogramas com detecção por espectrometria de massas das amostras de xampus de 11, 12, 13 e 14. Voltagem do capilar: 3500 V; voltagem do cone da amostra: 20 V; voltagem do cone de extração: 3 V; temperatura de dessolvatação 350 °C; temperatura da fonte de ionização: 120 °C; energia de ionização 2 V e energia de colisão 5 V.

Com base nos cromatogramas foi possível verificar que a amostra que apresentou a menor quantidade de interferentes foi a amostra 1. Porém, monitorando as massas das NA em estudo, notou-se que no intervalo de massas correspondente a NDELA e NMOR há a presença de interferentes os quais podem interferir nos sinais desses analitos. Num compromisso entre uma amostra com ausência de interferentes no espectro de massas como um todo e interferentes no mesmo intervalo de massas da NDELA, NDMA, NMOR e NDEA, optou-se por utilizar como branco a amostra de número 3. Em princípio, não foram detectadas a presença de NA nas amostras analisadas, o que indica que (i) não há NA nas amostras analisadas ou (ii) a eficiência de extração é muito baixa.

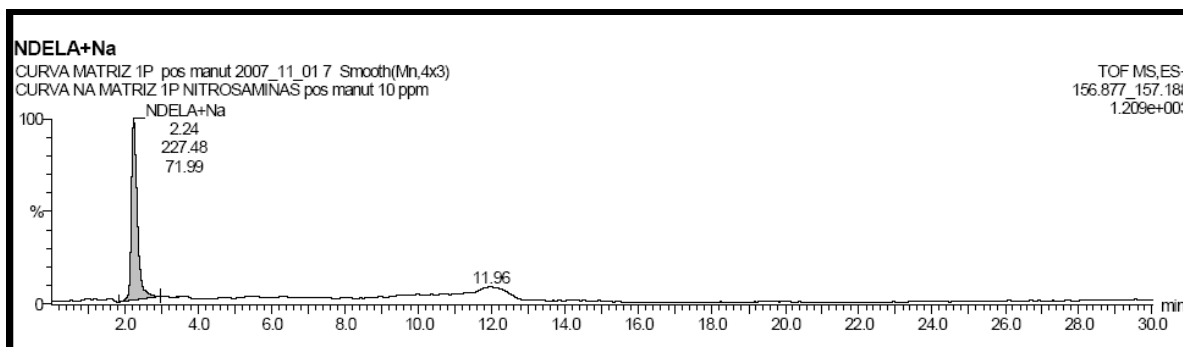
Após escolha da amostra que seria utilizado como branco foi avaliada a eficiência de extração, mediante fortificação das amostras com NDELA, NDMA, NMOR em vários níveis de concentração. Foram construídas curvas analíticas para avaliar a linearidade e estimar a detectabilidade.

#### **IV.4.4.4 Curva analítica na matriz**

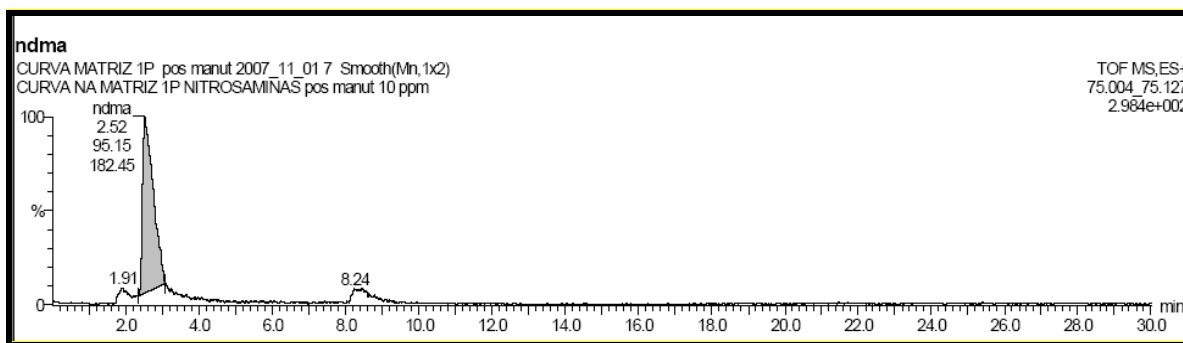
Foram construídas curvas analíticas tomando a amostra de xampu 3 como matriz branco. A curva analítica para cada NA foi construída fortificando 1,0 g de xampu em sete níveis de concentração no intervalo de  $2,5 \mu\text{g g}^{-1}$  a  $50,0 \mu\text{g g}^{-1}$  (o que corresponde a uma concentração final de  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , considerando uma recuperação de 100%). Como padrão interno foi empregado a NDEA na concentração de  $150 \mu\text{g g}^{-1}$  o que corresponde a uma concentração final de  $30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Para o preparo das amostras fortificadas foi empregado o procedimento descrito no item IV.4.4.3, porém o eluato foi avolumado para 5,0 mL em vez de 10,0 mL.

Nas **Figuras IV.39, IV.40 e IV.41** são apresentados os cromatogramas da NDELA (aduto), NDMA e NMOR para um nível de fortificação de  $50,0 \mu\text{g g}^{-1}$ .

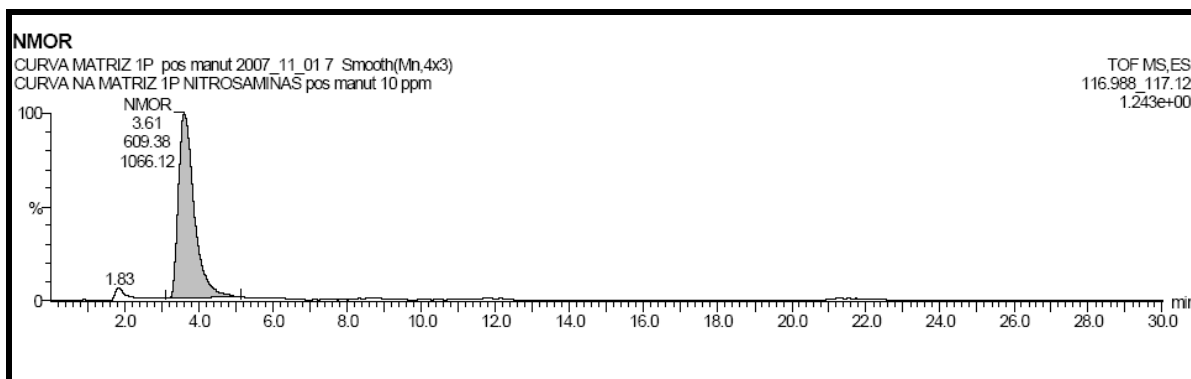


**Figura IV.39** – Cromatograma, utilizando espectrometria de massa, obtido para NDELA (aduto), para um nível de fortificação de  $50,0 \mu\text{g g}^{-1}$ . Coluna: C18 XTerra™. Fase móvel  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  com eluição gradiente (**Tabela IV.2**) numa vazão de  $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ .



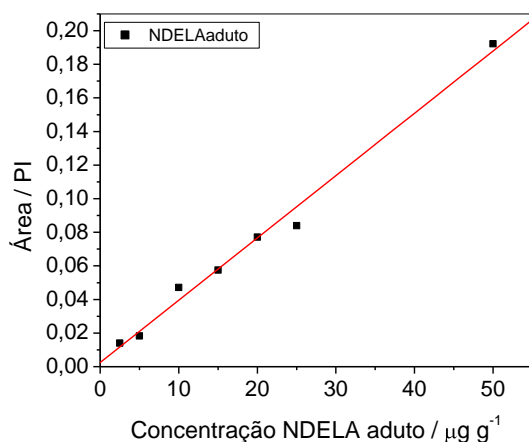
**Figura IV.40** – Cromatograma, utilizando espectrometria de massa, obtido para NDMA para um nível de fortificação de  $50,0 \mu\text{g g}^{-1}$ . Coluna: C18 XTerra™. Fase móvel  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  com eluição gradiente (**Tabela IV.2**) numa vazão de  $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ .



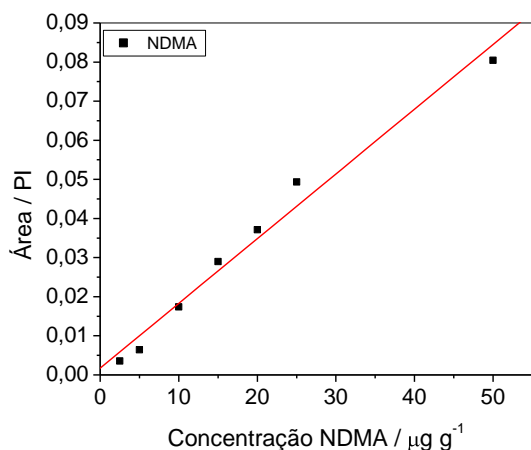


**Figura IV.41** – Cromatograma, utilizando espectrometria de massa, para NMOR para um nível de fortificação de  $50,0 \mu\text{g g}^{-1}$ . Coluna: C18 XTerra™. Fase móvel  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  com eluição gradiente (**Tabela IV.2**) numa vazão de  $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ .

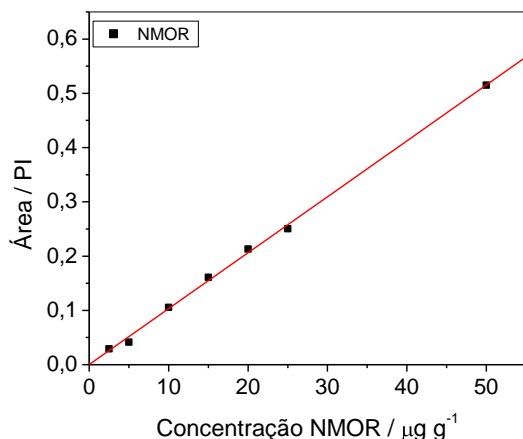
As curvas analíticas obtidas estão apresentadas nas **Figuras IV.42 a IV.44**.



**Figura IV.42** – Curva analítica obtida para o aduto da NDELA, no intervalo de concentração de  $2,5$  a  $50,0 \mu\text{g g}^{-1}$ . Coluna: C18 XTerra™. Fase móvel  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  com eluição por gradiente (**Tabela IV.2**) numa vazão de  $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ .



**Figura IV.43–** Curva analítica obtida para a NDMA, no intervalo de concentração de 2,5 a 50,0  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Coluna: C18 XTerra™. Fase móvel  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  com eluição por gradiente (Tabela IV.2) numa vazão de 0,25  $\text{mL min}^{-1}$ .



**Figura IV.44 –** Curva analítica obtida para a NMOR, no intervalo de concentração de 2,5 a 50,0  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Coluna: C18 XTerra™. Fase móvel  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  com eluição por gradiente (Tabela IV.2) numa vazão de 0,25  $\text{mL min}^{-1}$ .

Os valores das figuras de mérito faixa linear, linearidade e sensibilidade estão apresentados na **Tabela IV.19**.

**Tabela IV.19 –** Parâmetros obtidos das curvas analíticas na matriz, para as NA, utilizando LC-MS/MS Q ToF

| Parâmetros  | NDELA <sub>aduto</sub> | NDMA       | NMOR       |
|---|------------------------|------------|------------|
| <b>Faixa Linear do método (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b> | 2,5 a 50,0             | 2,5 a 50,0 | 2,5 a 50,0 |
| <b>Linearidade</b>  | 0,995                  | 0,990      | 0,999      |
| <b>Sensibilidade A/<math>\mu\text{g g}^{-1}</math></b>          | 0,0037                 | 0,0016     | 0,0103     |
| <b>LOD (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>                    | 0,8                    | 0,8        | 0,8        |
| <b>LOQ (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>                    | 2,5                    | 2,5        | 2,5        |

LOD: limite de detecção do método; LOQ: limite de quantificação do método.

Com os dados obtidos pode-se observar que a curva analítica obtida na matriz apresentou valores de linearidade satisfatórios no intervalo estudado, porém, com esse procedimento não seria possível determinar concentrações muito menores que o primeiro nível de concentração avaliado, ou seja,  $2,5 \mu\text{g g}^{-1}$ . Esse nível é muito elevado para o propósito do método. O principal problema neste preparo de amostra é a diluição dos analitos anterior a quantificação, sendo que uma das vantagens a ser explorada na extração em fase sólida é a concentração. Portanto, a metodologia descrita por SCHOTHORST e SOMERS (2005) e testada neste trabalho não se mostrou vantajosa por não viabilizar a determinação das NA na ordem de  $\text{ng g}^{-1}$ . O procedimento foi avaliado também aumentando a quantidade de amostra para 2,0 g. No entanto, o resultado não melhorou significativamente.

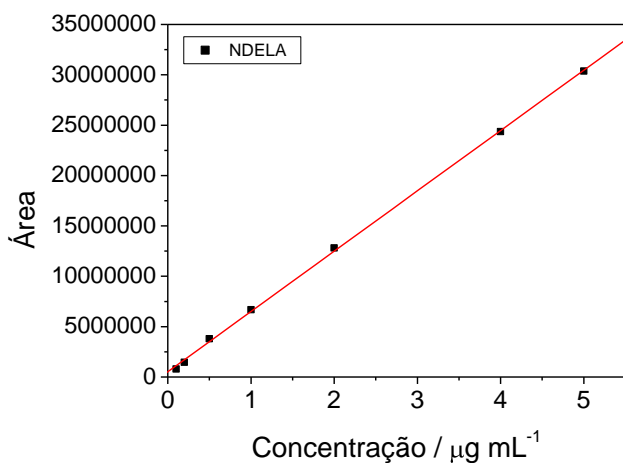
O equipamento não estava disponível para estudos adicionais e de qualquer forma deveria ser empregado apenas para a confirmação de identidade. Sendo assim, foi desenvolvido um método usando LC-MS para a determinação das NA em amostras de xampu, sendo que os outros sistemas de detecção avaliados, até o momento, não apresentaram seletividade e detectabilidade adequados.

#### **IV.4.5 - Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector de espectrometria de massas (LC-MS)**

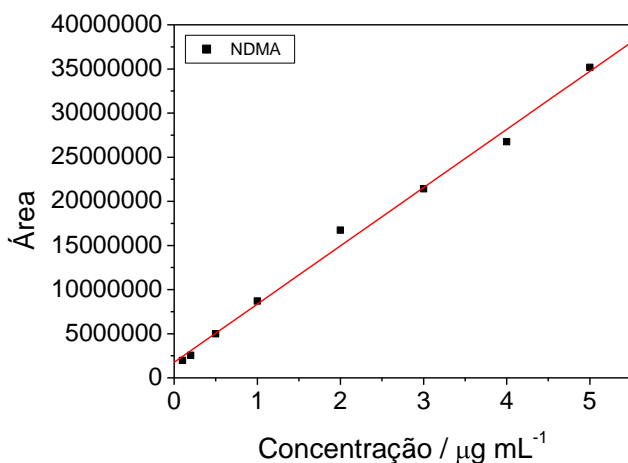
Como os parâmetros para detecção por espectrometria de massas já haviam sido otimizados para a técnica de LC-MS/MS Q ToF, estes foram apenas verificados e confirmados para o sistema LC-MS. As condições estão apresentadas no item IV.3.4.5. Foi verificado que a adição de acetato de amônio na fase móvel aumenta a detectabilidade das NA. Por esse motivo, a fase móvel foi modificada com este sal e o gradiente utilizado está especificado na **Tabela IV.3.**

#### IV.4.5.1 - Curva analítica

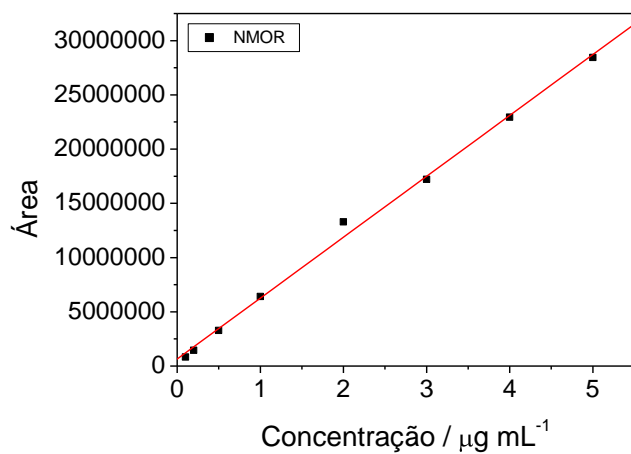
Para construção das curvas analíticas foram monitoradas as massa/cargas 135, 75 e 117 para NDELA, NDMA e NMOR, respectivamente. As curvas analíticas no intervalo de concentração de 0,10 a 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  no solvente estão apresentadas nas **Figuras IV.45-47** e os cromatogramas característicos na **Figura IV.48**. Os resultados obtidos para as figuras de mérito encontram-se na **Tabela IV.20**.



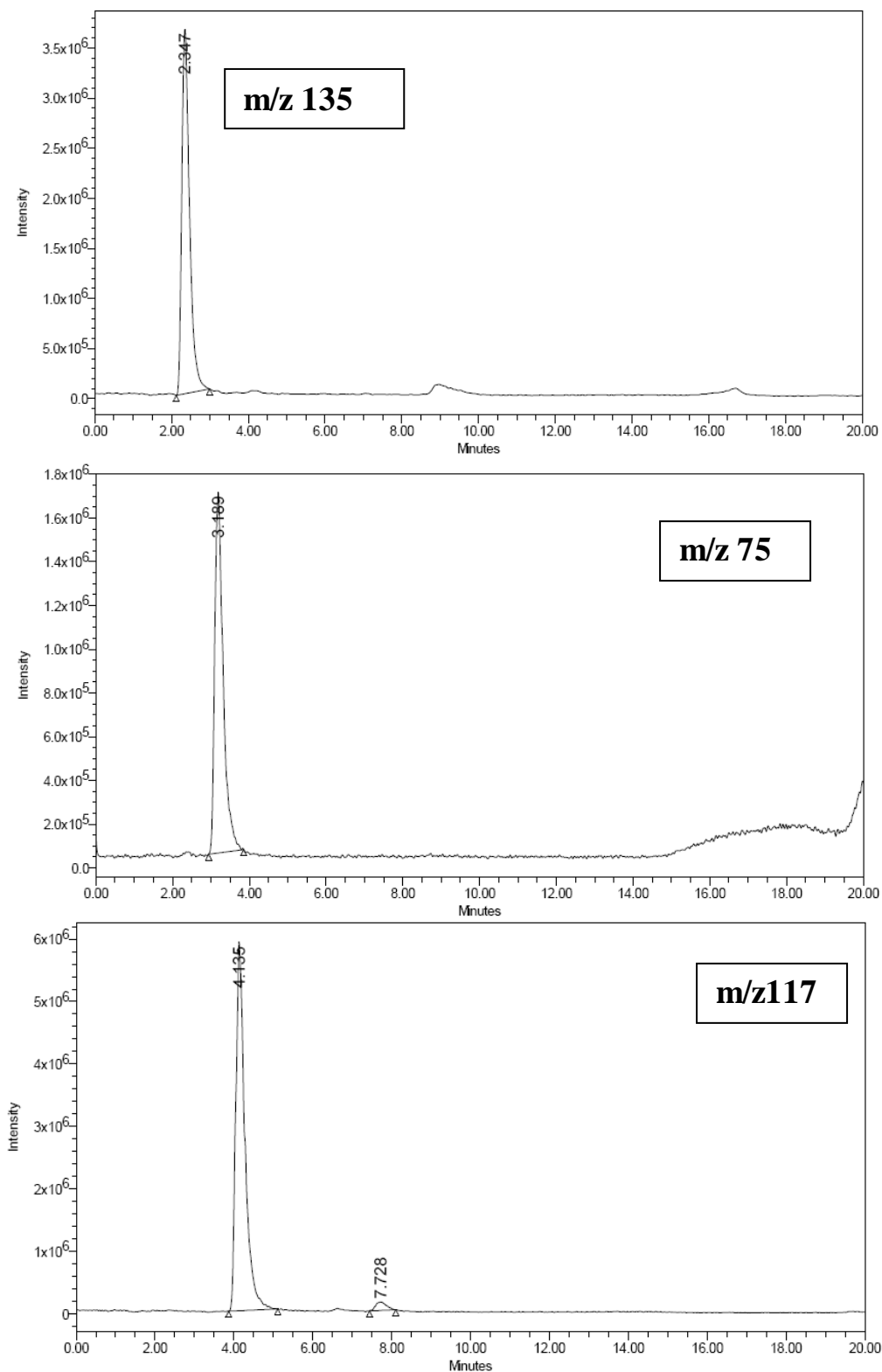
**Figura IV.45** - Curva analítica para NDELA no intervalo de 0,1 a 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , utilizando LC-MS. Condições descritas em IV.3.4.5.



**Figura IV.46** - Curva analítica para NDMA no intervalo de 0,1 a 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , utilizando LC-MS. Condições descritas em IV.3.4.5.



**Figura IV.47** - Curva analítica para NMOR no intervalo de 0,1 a 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , utilizando LC-MS. Condições descritas em IV.3.4.5.



**Figura IV.48** – Cromatogramas característicos obtidos para a NDELA, NDMA e NMOR, na concentração de  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , utilizando LC-MS. Detecção no modo SIM. Condições descritas em IV.3.4.5.

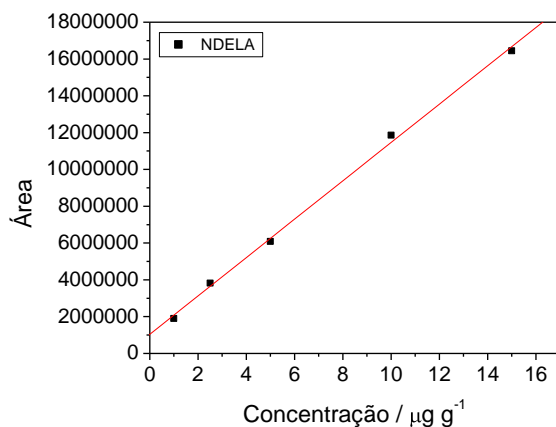
**Tabela IV.20** – Parâmetros obtidos das curvas analíticas para as NA utilizando LC-MS.

| Parâmetros                                    | NDELA     | NDMA      | NMOR      |
|---|-----------|-----------|-----------|
| Faixa Linear ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )        | 0,1 a 5,0 | 0,1 a 5,0 | 0,1 a 5,0 |
| Linearidade                                   | 0,9997    | 0,9972    | 0,9984    |
| Sensibilidade $\text{uA}/\mu\text{g mL}^{-1}$ | 5,99e6    | 6,59e6    | 5,61e6    |
| LDI* ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )                | 0,03      | 0,03      | 0,03      |

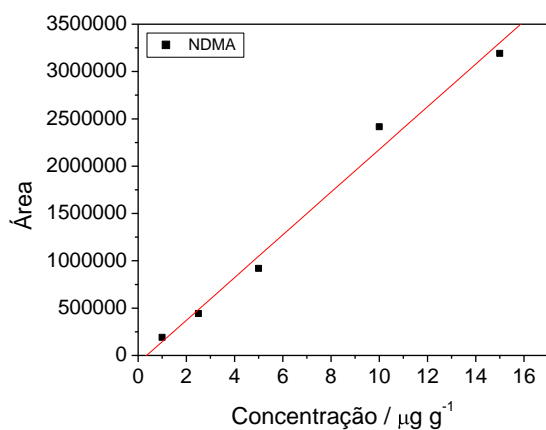
(\*) LDI: limite de detecção do instrumento.

Otimizado o método para determinação das NA e estimada a faixa linear e o limite de detecção do instrumento, a próxima etapa foi a construção da curva analítica usando fortificação de uma matriz branco. Inicialmente foi empregada a amostra de xampu 3 como amostra branca com base nos resultados obtidos pelo LC-MS/MS Q ToF. No entanto, na análise usando a LC-MS com o preparo de amostra descrito em IV.3.4.5.1 que permitiu a detecção de quantidades menores de NA, foi verificada a presença de NDELA e interferentes próximos aos tempo de retenção dessa NA nesta amostra. Por esse motivo, para construção das curvas analíticas na matriz foi utilizado como branco apenas a base do xampu (disponível comercialmente para preparação de xampu).

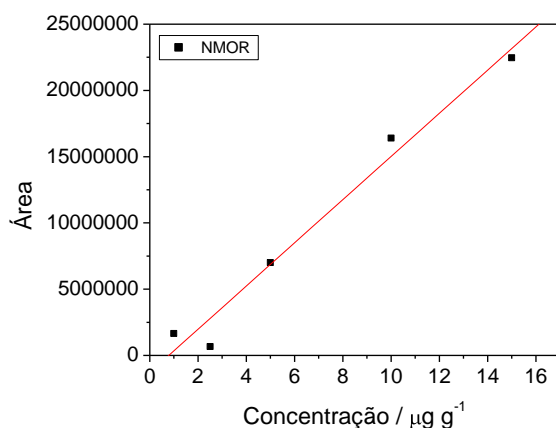
As curvas analíticas na matriz estão apresentadas nas **Figuras IV.49 a IV.51** e os resultados obtidos para as figuras de mérito são descritos na **Tabela IV.21**.



**Figura IV.49** - Curva analítica para N-nitrosodietanolamina no intervalo de fortificação de 1 a 15  $\mu\text{g g}^{-1}$ , utilizando LC-MS. Condições descritas em IV.3.4.5.



**Figura IV.50** - Curva analítica para N-nitrosodimetilamina no intervalo de fortificação de 1 a 15  $\mu\text{g g}^{-1}$ , utilizando LC-MS. Condições descritas em IV.3.4.5.



**Figura IV.51** - Curva analítica para N-nitrosomorfolina no intervalo de fortificação de 1 a 15  $\mu\text{g g}^{-1}$ , utilizando LC-MS. Condições descritas em IV.3.4.5.



**Tabela IV.21** – Parâmetros obtidos das curvas analíticas na matriz para as NA utilizando LC-MS.

| Parâmetros   | NDELA      | NDMA       | NMOR       |
|--|------------|------------|------------|
| Faixa Linear ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )                            | 1,0 a 15,0 | 1,0 a 15,0 | 1,0 a 15,0 |
| Linearidade  | 0,998      | 0,993      | 0,988      |
| Sensibilidade ( $\times 10^6$ ) $\text{uA}^*/\mu\text{g g}^{-1}$ | 1,04       | 0,22       | 1,63       |
| LOD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )                                     | 0,3        | 0,3        | 0,3        |
| LOQ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )                                     | 1,0        | 1,0        | 1,0        |

(\*)uA: unidade de área. LOD: limite de detecção do método. LOQ: limite de quantificação do método.

De todos os sistemas de detecção avaliados em combinação com os preparos de amostras, o espectrômetro de massas foi o mais promissor. Como não se tem informações disponíveis a respeito do nível de contaminação de xampus no Brasil por NA e também ausência de limite máximo de resíduo para este composto em xampu, o método LC-MS foi validado.

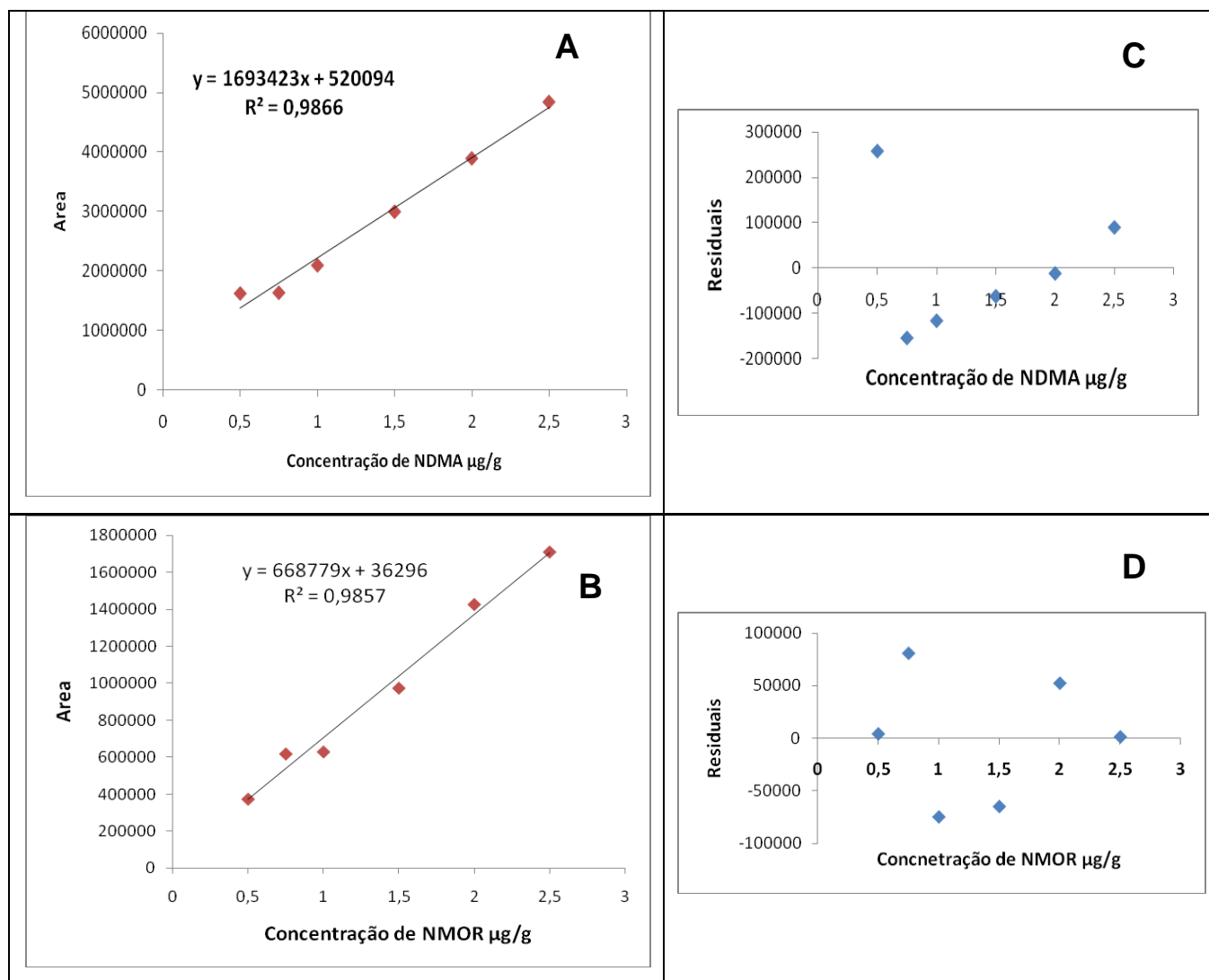
#### IV.4.5.2 - Validação do método LC-MS

Para a validação do método foram avaliados os seguintes parâmetros: faixa linear, linearidade, sensibilidade, precisão intra- e inter-ensaio, exatidão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).

As curvas analíticas foram construídas mediante fortificação de uma amostra de base de xampu, adquirida no comércio local, que foi considerada como amostra branco. As curvas obtidas para a NDMA e NMOR são mostradas na **Figura IV.52** e os dados obtidos de sensibilidade e linearidade encontram-se na **Tabela IV.22**. Também são apresentados os gráficos de resíduos para ambas as NA (**Figura IV.52**). Para a NDELA não foi obtido linearidade adequada e, portanto, os resultados não serão apresentados. Uma justificativa para esse fato é que a concentração do acetato de amônio foi aumentada em 10 vezes em relação aos estudos anteriores, uma vez que em um teste preliminar foi verificado que

nestas condições seria possível diminuir o LOQ. No entanto, foi observado que a curva analítica para a NDELA perdeu a linearidade.

Considerando a linearidade superior a 0,99 ficou estabelecida a faixa linear para a NDMA e NMOR no intervalo de concentração de 0,5 a 2,5  $\mu\text{g g}^{-1}$ .



**Figura IV.52** - Curvas analítica para (A) N-nitrosodimetilamina e (B) N-nitrosomorfolina no intervalo de 0,5 a 2,5  $\mu\text{g g}^{-1}$ , utilizando LC-MS. Condições descritas em IV.3.4.5. Os gráficos de resíduos para a N-nitrosodimetilamina e N-nitrosomorfolina estão apresentados em C e D.

Para a validação de métodos em um único laboratório (*single-laboratory validation*), que é o enfoque proposto neste trabalho, duas etapas são relevantes para a obtenção da precisão: (i) precisão intra-ensaio: sob condições de repetibilidade, descreve as variações observadas durante análises em um curto espaço de tempo; e (ii) precisão inter-ensaios: descreve o grau de variações observadas em diferentes condições (geralmente em dias diferentes). Os resultados obtidos e expressos como o desvio padrão relativo estão apresentados na **Tabela IV.22**.

Expressando a precisão em termos de coeficientes de variação (CV) ou estimativa do desvio padrão relativo (RSD), a FDA e a ANVISA recomendam (para análise de resíduos) que os resultados não excedam 15% de CV (exceto para o limite de quantificação, o qual não deve exceder 20% do CV). Já a IUPAC estabelece que os resultados obtidos não devam exceder 30% do valor central. Os resultados obtidos, embora altos, podem ainda ser considerados aceitáveis para o propósito do método. Cabe destacar que não existe um limite máximo de resíduo estabelecido para NA em cosméticos.

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro, usando um procedimento experimental para uma mesma amostra por repetidas vezes. A exatidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (tendência ou *bias*). A exatidão do método foi avaliada mediante teste de recuperação. Para tanto, foram fortificadas amostras branco de xampu em três níveis de concentração. As análises foram realizadas em quintuplicata. Para o menor nível de concentração avaliado ( $0,50 \mu\text{g g}^{-1}$ ) a exatidão foi de 125 e 101% para a NDMA e NMOR, respectivamente. Para concentrações maiores ( $1,0$  e  $1,5 \mu\text{g g}^{-1}$ ) os valores de recuperação ficaram no intervalo de 88 a 107%. Esses valores são aceitáveis dentro dos objetivos do método.

Em termos gerais o limite de detecção é a menor quantidade ou concentração do analito na amostra que pode ser diferenciada, de forma confiável, do zero ou do ruído de fundo. De modo geral, o LOD é definido como sendo a

menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. A definição para o limite de quantificação (LOQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Neste trabalho, os limites de detecção e quantificação foram estimados pela razão sinal/ruído de 3 e 10, respectivamente. Os valores estão apresentados na **Tabela IV.22**. Esses valores ainda são altos dentro do pretendido, embora tenham sido os melhores obtidos em comparação com as outras técnicas avaliadas (vide item IV.4.6).

**Tabela IV.22** – Parâmetros obtidos da validação do método para determinação de NA utilizando LC-MS.

| Parâmetros   | NDMA      | NMOR      |
|--|-----------|-----------|
| <b>Faixa Linear (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>            | 0,5 a 2,5 | 0,5 a 2,5 |
| <b>Linearidade (r)</b>   | 0,9933    | 0,9928    |
| <b>Sensibilidade <math>\text{uA}^*/\mu\text{g g}^{-1}</math></b> | 1693423   | 668779    |
| <b>Precisão Intra-dia (RSD, %)</b>                               |           |           |
| Nível 0,50 $\mu\text{g g}^{-1}$ (n=5)                            | 9,0       | 22,6      |
| Nível 0,75 $\mu\text{g g}^{-1}$ (n=5)                            | 5,5       | 11,3      |
| Nível 1,00 $\mu\text{g g}^{-1}$ (n=5)                            | 7,5       | 23,4      |
| <b>Precisão Inter-dia (RSD, %)</b>                               |           |           |
| Nível 0,50 $\mu\text{g g}^{-1}$ (n=10)                           | 14,3      | 27,1      |
| Nível 0,75 $\mu\text{g g}^{-1}$ (n=10)                           | 6,4       | 24,8      |
| Nível 1,00 $\mu\text{g g}^{-1}$ (n=10)                           | 7,1       | 28,8      |
| <b>Exatidão (n=5), %</b>   |           |           |
| Nível 0,50 $\mu\text{g g}^{-1}$                                  | 125,0     | 101,3     |
| Nível 0,75 $\mu\text{g g}^{-1}$                                  | 87,8      | 106,9     |
| Nível 1,00 $\mu\text{g g}^{-1}$                                  | 93,1      | 93,1      |
| <b>LOD (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>                     | 0,2       | 0,2       |
| <b>LOQ (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>                     | 0,5       | 0,5       |

(\*)uA: unidade de área. LOD: limite de detecção do método. LOQ: limite de quantificação do método

#### IV.4.5.3 - Análise de amostras

Um total de doze amostras de xampu adquiridas na região de Campinas, SP foram analisadas quanto à presença de NDMA e NMOR usando o método LC-MS previamente validado. Os resultados estão apresentados na **Tabela IV.23**.

**Tabela IV.23** – Resultados da presença de NA nas amostras de xampu.

| Amostra | Concentração média <sup>a</sup> em $\mu\text{g g}^{-1}$<br>(RSD,%) |             |
|---------|--|-------------|
|         | NDMA   | NMOR        |
| 1       | nd   | 2,1 (24,3%) |
| 2       | < LOQ  | 1,0 (9,0%)  |
| 3       | 0,55 (24,5%)   | < LOQ       |
| 4       | nd   | 1,2 (16,7%) |
| 5       | 0,70 (3,7%)  | <LOQ        |
| 6       | nd   | nd          |
| 7       | <LOQ   | nd          |
| 8       | nd   | nd          |
| 9       | < LOD  | nd          |
| 10      | 0,68 (8,7%)  | < LOQ       |
| 11      | < LOD  | < LOQ       |
| 12      | < LOD  | 1,0 (4,3%)  |

a: n=3; RSD: estimativa do desvio padrão relativo. LOQ: limite de quantificação ( $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ ), LOD: limite de detecção ( $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ ).nd: não detectado.

Dez das doze amostras analisadas apresentaram a presença de uma das duas NA: NDMA ou NMOR. A maior concentração encontrada foi na amostra 1, que apresentou um teor de NMOR de  $2,1 \mu\text{g g}^{-1}$ . Esse valor é considerado bastante elevado e indica a necessidade do controle de xampus quanto à

presença de NA. Cabe destacar que a quantidade de NA encontrada em xampus comercializados no exterior citada na literatura está entre 0,017 e 7,64  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

#### IV.4.6 - Comparação entre os métodos

A seguir será apresentada uma comparação entre os métodos avaliados durante a execução do trabalho para a determinação de N-nitrosaminas em xampu. Os métodos avaliados foram:

- Cromatografia líquida de alta eficiência associada com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD);
- Cromatografia líquida de alta eficiência associada com detector eletroquímico, célula *wall-jet* (HPLC-ED<sub>wj</sub>);
- Cromatografia líquida de alta eficiência associada com detector eletroquímico, célula *thin layer* (HPLC-ED<sub>tl</sub>);
- Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa (ionização por eletrospray) LC-MS.

Na **Tabela IV.24** estão apresentados os valores dos limites de detecção do instrumento (LDI) obtidos para as diferentes técnicas avaliadas. Os limites de detecção do instrumento se referem a menor concentração que pode ser detectada no sistema de detecção e foram estimados pela razão sinal/ruído, empregando, para tanto, apenas os padrões analíticos solubilizados no solvente. Portanto, todas as concentrações são dadas em unidade de massa por volume.

**Tabela IV.24** – Limite de detecção do instrumento, encontrado para os quatro sistemas de detecção utilizados. N-nitrosaminas no solvente.

| Técnica                              | LDI* ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) |      |      |
|--------------------------------------|--------------------------------|------|------|
|                                      | NDELA                          | NDMA | NMOR |
| HPLC - DAD                           | 0,02                           | 0,02 | 0,02 |
| HPLC – ED – Célula <i>wall-jet</i>   | 0,05                           | 0,2  | 0,05 |
| HPLC – ED – Célula <i>thin-layer</i> | 0,1                            | 0,1  | 0,05 |
| LC – MS                              | 0,03                           | 0,03 | 0,03 |

(\*) LDI: limite de detecção do instrumento.

Os resultados obtidos indicam que as técnicas que permitem melhor detectabilidade são a HPLC-DAD e LC-MS. No entanto, a primeira carece de seletividade e, portanto, a técnica que apresenta o melhor compromisso entre seletividade e detectabilidade indubitavelmente é a LC-MS.

Os limites de quantificação do método obtidos para as técnicas anteriormente relacionadas estão apresentadas na **Tabela IV.25**. O limite de quantificação do método é obtido pela fortificação de matrizes branco de xampu em concentrações decrescentes até obtenção de uma razão sinal/ruído 10.

**Tabela IV.25** – Limite de quantificação, encontrado para os quatro sistemas de detecção utilizados. Nitrosaminas adicionadas à matriz de xampu.

| Técnica                              | LOQ* ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) |      |      |
|--------------------------------------|-------------------------------|------|------|
|                                      | NDELA                         | NDMA | NMOR |
| HPLC - DAD                           | 1,0                           | 1,0  | 0,5  |
| HPLC – ED – Célula <i>wall-jet</i>   | -                             | 3,0  | 1,0  |
| HPLC – ED – Célula <i>thin-layer</i> | -                             | 5,0  | 5,0  |
| LC – MS                              | 0,5                           | 0,5  | 0,5  |

(\*) LOQ: limite de quantificação do método.



# **CAPÍTULO V**

## **Conclusões**



## V - CONCLUSÕES

- As N-nitrosaminas NDMA, NDEA, NDELA e NMOR são eletroativas no eletrodo de diamante dopado com boro, apresentando um pico anódico irreversível em aproximadamente 1,8 V. Os radicais ligados ao grupo nitroso influenciam o potencial de pico anódico. Enquanto grupos alquilas favorecem a oxidação, átomos de oxigênio dificultam o processo e deslocam o potencial de pico para potenciais maiores.
- A reação de oxidação destas NA sobre o eletrodo de DDB não depende de protonação no intervalo de pH de 3 a 8 e o processo é controlado por difusão.
- A voltametria de onda quadrada mostrou-se adequada para quantificar as NA sob o eletrodo DDB, no entanto, não é possível determinar cada composto isoladamente, ou seja, a técnica não é seletiva. Como o processo de oxidação ocorre no grupo nitroso comum a todas as N-nitrosaminas, apenas é possível a determinação de NA totais. Cabe destacar que essa informação pode ser útil para fins de triagem de amostras contaminadas.
- A célula eletroquímica construída usando como eletrodo de trabalho o DDB e referência e auxiliar, Pt e aço, respectivamente, mostrou-se adequada para ser associado ao cromatógrafo líquido de alta eficiência.
- O detector eletroquímico com eletrodo DDB possibilita a determinação tanto de N-nitrosaminas não voláteis como voláteis, permitindo o estabelecimento de métodos analíticos de aplicação geral para a determinação destes compostos.
- A coluna octadecil XBridge™ é adequada para a separação de NDELA, NMOR, NDMA e NDEA, usando como fase móvel água/acetonitrila e eluição por gradiente.
- As amostras de xampu contêm uma matriz complexa e a composição da formulação depende do fabricante. Isso dificulta o estabelecimento de um método de preparo de amostra único e também a seleção de uma amostra branco para estabelecer o método analítico.

- A etapa crítica do processo é o preparo de amostras, que deve além de eliminar os interferentes, concentrar os analitos para a quantificação. A interferência ou não de componentes da matriz do xampu depende da seletividade do detector utilizado. Para os detectores DAD e ED o melhor preparo de amostras, no sentido de eliminar os interferentes, foi a extração em fase sólida empregando cartuchos octadecil. No entanto, neste caso, o limite de quantificação foi prejudicado (HPLC-DAD: NDELA  $1 \mu\text{g g}^{-1}$ ; NDMA  $1 \mu\text{g g}^{-1}$ ; NMOR  $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ ; e HPLC-ED: NDMA  $3 \mu\text{g g}^{-1}$  e NMOR  $1 \mu\text{g g}^{-1}$ ) uma vez que não foi possível a concentração dos analitos anterior análise cromatográfica.
- Não houve problemas de interferências da matriz, usando LC-MS/MS Q-ToF com preparo de amostra por extração em fase sólida (cartuchos octadecil). No entanto, o limite de quantificação estabelecido foi de  $1 \mu\text{g g}^{-1}$  para NDELA e NMOR e  $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$  para NDMA. Esses níveis são altos em relação a outros dados citados na literatura, que relatam valores menores do que  $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ , no entanto usando um analisador de massas do tipo triplo quadrupolo.
- Usando dispersão da matriz em fase sólida aliada à extração em fase sólida (fase normal), embora se consiga concentrar os analitos, houve também concentração de interferentes que impossibilitaram a quantificação das N-nitrosaminas por HPLC-DAD. No detector eletroquímico e no LC-MS/MS este procedimento não foi avaliado.
- A cromatografia líquida de alta eficiência associada ao detector eletroquímico, usando o eletrodo de diamante dopado com boro, não apresentou a seletividade e detectabilidade adequada para a determinação de resíduos de NA em xampu. O mesmo foi verificado usando o detector de arranjo de diodos.
- Indubitavelmente, o detector de massas tem a seletividade requerida, no entanto, a detectabilidade nos sistemas avaliados não foi adequada usando o preparo de amostras onde não está incluso uma etapa de concentração após limpeza dos extratos.

## **CAPÍTULO VI**

### **Referências Bibliográficas**



- ANGLADA, A.; IBANEZ, R.; URTIAGA, A.; ORTIZ, I.; *Catalysis Today*, **2010**, 151, 178.
- ANVISA, 2003. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, RE nº 899, de 29/05/2003.
- ANVISA, 2008. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. <http://e-legis.anvisa.gov.br>, acessada em setembro 2008.
- ARCHER, M. C.; TANNENBAUM, S. R., WISHNOK, J. S.; *IARC Sci. Publ.* **1976**, 14, 141.
- BARNES, J. M.; MAGEE, P. N.; *Brit. J. Ind. Med.* **1954**, 11, 167.
- BARTSH, H., MONTESANO, R.; *Carcinogeneses* **1984**, 5, 1381.
- BENSALAH, N.; AHMADI, M. F.; GADRI, A.; *Can. J. Civ. Eng.*, **2009**, 36, 683.
- BENSALAH, N.; ABDEL-WAHAB, A.; *Air, Soil and Water Research*, **2010**, 3, 45.
- BEYER, K. H., JR, BERGFELD, W. F., BERNDT, W. O., BOUTWELL, R. K., CARLTON, W. W.; HOFFMANN, D. K.; SCHROEDER, A. L.; *J. Am. Coll. Toxicol.* **1983**, 2, 183.
- BILLEDEAU S. M.; HEINZE, T. M.; WILKES, J. G.; *J. Chromatogr. A* **1994**, 688, 55.
- BONFANTI, M.; MAGAGNOTTI, C.; FANELLI, R.; AIROLDI, L.  $\beta$ -Oxidation of N-nitrosodiethanolamine in different animal species in vitro and in vivo. Em: Bartsch, H., O'Neill, I.; Schulte-Hermann, R., The Relevance of N-Nitroso Compounds to Human Cancer. Exposures and Mechanisms, eds., *IARC Sci. Publ. No. 84*, IARC Press: Lyon, France, **1991**, 91–93.
- BORGHESANI, G.; PULIDORI, F.; PEDRIALI, R.; BIGHI, C. *J. Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, **1971**, 32(2), 303.
- BOUVRETTE, P.; HRAPOVIC, S.; MALE, K. B.; LUONG, J. H. T. *J. of Chromatography A*, **2006**, 1103, 248.
- BRILLAS, E.; GARRIDO, J. A.; RODRÍGUEZ, R. M.; ARIAS, C.; CABOT, P. L.; CENTELLAS, F.; *Portugaliae Electrochimica Acta*, **2008**, 26, 15.
- BUNDSGESUNDHEITASMT, *Bundesgesundheitsblatt*, **1987**, 30, 114.
- CAMEO Chemicals, <http://cameochemicals.noaa.gov/>, acessada em junho 2010.

- CHAILAPAKUL, O.; POPA, E.; TAI, H.; SARADA, B. V.; TRYK, D. A.; FUJISHIMA, A. *Electrochem. Commun.*, **2000**, 2, 422.
- CHAILAPAKUL, O.; SIANGPROH, W.; SARADA, B. V.; TERASHIMA, C.; RAO, T. N.; TRYK, D. A.; FUJISHIMA, A. *Analyst*, **2002**, 127, 1164.
- CHAILAPAKUL, O.; AMATATONGCHAI, M.; WILAIRAT, P.; GRUDPAN, K.; NACAPRICHA. *Talanta*, **2004**, 64, 1253-1258.
- CHALLIS, B. C.; TREW, D. F.; GUTHRIE, W. G.; ROPER, D. V.; *Int. J. Cosmet. Sci.* **1995**, 17, 119.
- CHIKU, M.; HORISAWA, K.; DOI, N.; YANAGAWA, H.; EINAGA, Y.; *Biosensors and Bioelectronics*, **2010**, 26, 235.
- CHOU, H. J.; *J. AOAC Int.* **1994**, 81, 943.
- CHUANUWATANAKUL, S.; CHAILAPAKUL, O.; MOTOMIZU, S.; *Analytical Sciences*, **2008**, 24.
- CODOGNOTO, L.; MACHADO, S.A.S.; AVACA, L.A. *J. Appl. Electrochem.*, **2003**, 33, 951.
- COLLIER, S. W.; MILSTEIN, S. R.; ORTH, D. S.; JAYASIMHULU, K.; *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1988**, 39, 329.
- Commission Directive 92/86/EEC de 21 de Outubro de 1992. *Off. J. European Comm.* **1992**, L325, 18.
- COSMETIC INGREDIENT REVIEW PANEL; *J. Amer. College Toxicol.* **1984**, 3, 139.
- DOUGLAS, M. L.; KABACOFF, B. L.; ANDERSON, G. A.; *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1978**, 29, 581.
- DUNNETT, P. C.; TELLING, G. M.; *Int. J. Cosmet. Sci.* **1984**, 6, 241.
- DUTRA, C. B.; RATH, S.; REYES, F. G. R.; *Alimento & Nutrição* **2007**, 18, 111.
- EC, 2002. European Commission. *Official Journal of the European Communities*, 17/08/2002, L221/8-36.
- EC, 2004. Comparative Study on Cosmetics Legislation in the EU and Other Principal Markets with Special Attention to so-called Borderline Products, Final Report, Risk & Policy Analysts Limited: Norfolk, UK, **2004**. 118.



- EISENBRAND, G.; BLANKART, M.; SOMMER, H.; WEBER, B.; N-Nitrosoalkanolamines in cosmetics. Em: O'Neil, I. K.; Chen, J.; Bartsch, H. Relevance to Human Cancer of N-Nitroso Compounds, Tobacco Smoke and Mycotoxins, eds.; IARC Scientific Publications No. 105, IARC Press: Lyon, France, **1991**, pp. 238–241.
- ENDER, F.; HAVRE, G.; HELGEBOSTAD, A.; KOPPANG, N.; MADSEN, R.; CEH, L.; *Naturwissenschaften* **1964**, 51, 637.
- ERICKSON, M. D.; LAKINGS, D. B.; DRINKWINE, A. D.; *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1985**, 36, 223.
- FAN, T. Y.; GOFF, U.; SONG, L.; FINE, D. H.; ARSENAULT, G. P.; BIEMANN, K.; *Food Cosmet. Toxicol.* **1977**, 15, 423.
- FDA, 2008. United States Food and Drugs Administration, [http://www.fda.gov/ora/inspect\\_ref/igs/cosmet.html](http://www.fda.gov/ora/inspect_ref/igs/cosmet.html), acessada em setembro 2008.
- FELLION, Y.; DE SMEDT, J.; BRUDNEY, N.; *IARC Sci. Publ.* **1980**, 31, 435.
- FERNANDEZ-MARCOTE, M. S. M.; MOCHON, M. C.; SANCHEZ, J. C. J.; PEREZ, A. G.; *Electroanalysis*, **1998**, 10, No. 7.
- FINE, D. H.; LIEB, F. R.; ROUNBEHLER, D. P.; *Anal. Chem.* **1975**, 47, 1188.
- FLOWER, C.; CARTER, S.; EARLS, A.; FOWLER, R.; HEWLINS, S.; LALLJIE, S.; LEFEBVRE, M.; MAVRO, J.; SMALL, D.; VOLPE, N.; *Int. J. Cosmet. Sci.* **2006**, 28, 21.
- FOX, J. B.; *Anal. Chem.* **1979**, 51, 1493.
- FUKUDA, Y.; MORIKAWA, Y.; MATSUMOTO, I.; *Anal. Chem.* **1981**, 53, 2000.
- GRANGER, M. C.; XU, J.; STROJEK, J. W.; SWAIN, G. M. *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 397, 145.
- GHASSEMPOUR, A; ABBACI, M.; TALEBPOUR, Z.; SPENGLER, B.; RÖMPP, A.; *J. Chromatogr.* **2008**, 1185, 43.
- GOSSER JR, K. D. **Cyclic Voltammetry**: Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms. New York, VCH, 1993. 97p.
- HASEBE, K.; OSTERYOUNG, J.; *Anal. Chem.* **1975**, 47, 2412.
- HAVERY, D. C.; CHOU, H. J.; *Cosmet. Toiletries* **1994**, 109, 53.

- HO, J. L.; WISNESKI, H.; YATES, R. L.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1981**, 64, 800.
- HOLLECK, L.; SCHINDLER, R.; *Zeitschrift fuer Elektrochemie und Angewandte Physikalische Chemie*, **1958**, 62, 942.
- HOLLAND, V. R.; *Cosmet. Technol.* **1981**, 3, 31.
- IARC. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some N-nitrosocompounds. IARC: Lyon, **1978**, 17.
- IKEDA, K; MIGLIORESE, K. G.; *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1990**, 41, 283.
- IVANDINI, T. A.; SARADA, B. V.; TERASHIMA, C.; RAO, T. N.; TRYK, D. A.; ISHIGURO, H.; KUBOTA, Y.; FUJISHIMA, A. *J.Electroanal. Chem.*, **2002**, 521, 117.
- IVANDINI, T. A.; HONDA, K.; RAO, T. N.; FUJISHIMA, A.; EINAGA, Y. *Talanta*, **2007**, 71, 648.
- IVERSEN, P. E.; *Acta Chemica Scandinavica*, **1971**, 25(6), 2337.
- IWAKI, M.; SATO, S.; TAKAHASHI, K.; SAKAIRI, H.; *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res.*, **1983**, 209, 1129.
- JACOB, G.; MOINET, C.; TALLEC, A.; *Electrochimica Acta*, **1982**, 27(10), 1417.
- KABACOFF, B. L.; LECHNER, R. J.; VIELHUBER, S. F.; DOUGLAS, M. L.; *ACS Symposium Series* **1981**, 174, 149.
- KABACOFF, B. L.; DOUGLAS, M. L.; ROSENBERG, I. E.; LEVAN, L. W.; PUNWAR, J. K.; VIELHUBER, S. F.; LECHNER, R. J.; *IARC Sci. Publ.* **1984**, 57, 347.
- KAPPANG, M. D.; WITEK, M.; BLAU, J.; SWAIN, G. M. *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 1188.
- KARGIN, YU. M.; GAFAROV, A. N.; IVSHIN, V. P.; KONDRANINA, V. Z.; SEMAKHINA, N. I.; KAZAKOVA, A. A.; PODKOVYRINA, T. A. K.; *J. Nov. Polyarogr., Tezisy Dokl. Vses. Soveshch. Polyarogr.*, 6th, **1975**, 99.
- KEEFER, L. K.; HANSEN, T. J.; Primary amine use and other strategies for preventing human exposure to N-nitroso compounds: application to cutting fluids. Em: N-nitroso compounds: Occurrence and biological effects. IARC: Lyon, **1982**, 245.
- KUJIMA, K.; TAKARAI, T.; SAITO, E.; *Natl. Inst. Hyg. Sci.* **1985**, 9, 32.
- KLEIN, D.; GIRARD, A. N.; DESMEDT, J.; FELLION, Y.; DEBRY, G.; *J. Cosmet. Toxicol.*, **1981**, 19, 223.

- LGC/GC/2007/002 – Government Chemist Programme – Alemanha.
- LIN, Y.; DING, C.; LIN, S.; *Zhongguo Gonggong Weisheng*, **2006**, 22(12), 1533.
- LOEPPKY, R. N.; *Drug Metab. Rev.* **1999**, 31, 175.
- LOURENÇÃO, B. C.; MEDEIROS, R. A.; ROCHA-FILHO, R. C.; MAZO, L. H.; FATIBELLO-FILHO, O.; *Talanta*, **2009**, 78, 748.
- MAGEE, P. N.; BARNES, J. M.; *J. Cancer* **1956**, 10, 114.
- MARTINS, I.; CANAES, L. C.; DORETTO, K. M.; RATH, R.; *Electroanalysis*, **2010**, 22(4), 455.
- MATYSKA, M. T.; PESEK, J. J.; YANG, L.; *J. Chromatogr.* **2000**, 887, 497.
- MILLER, B.; KALISH, R.; FELDMAN, L. C.; KATZ, A.; MORIA, N.; SHORT, K.; WHITE, A. E.; *J. Electrochem. Soc.*, **1994**, 141, L41.
- MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD, Great Britain. Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *Food Surveillance Paper* Nº32, 1992.
- MIRVISH, S. S.; GREENBLATT, M.; KOMMINENI, V. R. C.; *J. Nat. Cancer Institute* **1972**, 48, 1311.
- MIRVISH, S. S.; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1975**, 31, 325.
- MONTILLA, F.; MICHAUD, P.A.; MORALLON, E.; VASQUEZ, J. L.; CIMMINELLIS, Ch. *Electrochim. Acta*, **2002**, 47, 3509.
- MUNA, G. W.; SWOPE, V. M.; SWAIN, G. M.; PORTER, M. D.; *Journal of Chromatography A*, **2008**, 1210, 154.
- NIOSH, National Institute for Occupational for Safety and Health  
<http://www.cdc.gov/niosh/npg/default.html>, acessada em setembro 2008.
- NOTSU, H.; TATSUMA, T.; FUJISHIMA, A. *J. Electroanal. Chem.*, **2002**, 523, 86.
- OLIVEIRA, R. T. S.; SALAZAR-BANDA, G. R.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, A. A. *Electroanalysis*, **2008**, 20 (4), 396.
- ONG, J. T. H.; RUTHERFORD, B. S.; *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1980**, 31, 153.
- OSTERYOUNG, J.; O'DEA, J. J..In Bard, A. J. New York, Marcel Dekker, v. 14. 1982.

- PARK, H. J.; MAH, E.; BRUNO, R. S.; *Analytical Biochemistry*, **2010**, 407, 151.
- PEDROSA, V. A.; CODOGNOTO, L.; AVACA, L. A. *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, 14, 530.
- PLESKOV, Y.V. Synthetic diamond in electrochemistry, *Russian Chemical Reviews*, **1999**, 68(5), 381-392.
- PREUSSMANN, R.; STEWART, B. W. N-nitrosocarcinogens. *ACS Monographs* **1984**, 182, 643.
- PREECHAWORAPUN, A.; CHUANUWATANAKUL, S.; EINAGA, Y.; GRUDPAN, K.; MOTOMIZUD, S.; CHAILAPAKUL, O.; *Talanta*, **2006**, 68, 1726.
- POPA, E.; KUBOTA, Y.; TRYK, D. A.; FUJISHIMA, A. *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 1724.
- POWELL, J. B.; *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1987**, 38, 29.
- QUAISEROVÁ-MOCKO, V.; NOVOTNY, M.; SCHAEFER, L. S.; FINK, G.D.; SWAIN, G. M.; *Electrophoresis*, **2008**, 29, 441.
- RAMESHAM, R; ASKEW, R. F.; ROSE, M. F.; LOO, B. H.; *J. Electrochem. Soc.*, **1993**, 140, 3018.
- RAO, T. N.; TRYK, D. A.; HASHIMOTO, K.; FUJISHIMA, A.; *J. Electrochem. Soc.*, **1999**, 146, 680.
- RAO, T. N.; YAGI, I.; MIWA, T.; TRYK, D. A.; FUJISHIMA, A. *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 2506.
- RAO, T. N.; SARADA, B. V.; TRYK, D. A.; FUJISHIMA, A. *J. Electroanal. Chem.*, **2000**, 491, 175.
- RAO, T. N.; LOO, B. H.; SARADA, B. V.; TERASHIMA, C.; FUJISHIMA, A. *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 1578.
- RATIU, C.; MANEA, F.; LAZAU, C.; GROZESCU, I.; RADOVAN, C.; SCHOONMAN, J.; *Desalination*, **2010**, 260, 51.
- RATH, S.; REYES, F.G.R. *Em Handbook of Processed Meats and Poultry Analysis*; Nollet, L.; Toldrá, F.; eds.; Taylor & Francis Group, CRC Press: Boca Raton, USA, 2008, cap. 32.
- REYES, F. G. R.; SCANLAN, R. A.; *Bol. Soc. Bras. Ciênc. Tecnol. Alim.* **1984**, 18, 299.

- ROCHE, M. O. G.; MELIAN, M. G; PEREZ, R. C. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS, OMS, Metepec, Estado do México: México, Série Vigilancia, 13, 1994.
- ROLLMANN, B.; LOMBART, P.; RONDELET, J.; MERCHER, M.; *J. Chromatogr.* **1981**, 206, 158.
- ROSENBERG, I. E.; GROSS, J.; SPEARS, T.; *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1980**, 32, 237.
- ROSENBERG, I.; *CTFA Cosmetic J.* **1981**, 30.
- SCHMELTZ, I.; WENGER, A.; *Food Cosmetic. Toxicol.* **1979**, 17, 105.
- SCHOTHORST, R. C.; STEPHANY, R. W.; *Int. J. Cosmet. Sci.* **2001**, 23, 109.
- SCHOTHORST, R. C.; SOMERS, H. H.; *J. Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 381, 681.
- SIANGPROH, W.; NGAMUKOT, P.; CHAILAPAKUL, O. *Sens. Actuators B*, **2003**, 91, 60.
- SHIN, D.; TRYK, D. A.; FUJISHIMA, A. MUCK Jr, A.; CHEN, G.; WANG, J. *Electrophoresis*, **2004**, 25, 3017.
- SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L.A. *Química Nova*, **2003**, 26(1), 81.
- SOUZA, C. D.; BRAGA, O. C.; VIEIRA, I. C.; SPINELLI, A.; *Sensors and Actuators B*, **2008**, 135, 66.
- SPIEGELHALDER, B.; PREUSSMANN R.; *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1984**, 108, 160.
- SWAIN, G.M.; RAMESHAM, R. *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 345.
- SWANN, P. F. *J. Sci. Food Agric.* **1975**, 26, 1761.
- TERASHIMA, C.; RAO, T. N.; SARADA, B. V.; TRYK, D. A.; FUJISHIMA, A. *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 895.
- TERASHIMA, C.; RAO, T. N.; SARADA, B. V.; KUBOTA, Y.; FUJISHIMA, A. *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 1564.
- TELLING, G. M.; *Trends Anal. Chem.* **1982**, 1, 277
- VOHRA, S.K.; HARRINGTON, G.E.; *Food Cosmet. Toxicol.* **1981**, 19, 485.
- WALTERS, C. L; JOHNSON, E. M.; RAY, N.; *Analyst* **1970**, 95, 485.

- WALTERS, C. L.; *Food Additives and Contaminants* **1992**, 9, 441.
- WANG, L.; HSIA, H.; WANG, C.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2006**, 29, 1737.
- WANG, F.; GENG, N.; XU, C.; LU, J.; *Xiangjing Huazhuangpin*, **2010**, 2, 28.
- WANGFUENKANAGUL, N.; CHAILAPAKUL, O. *J.Pharm. Biomed. Anal.*, **2002**, 28, 841.
- WESTIN, J. B.; SPIEGELHALDER, B.; PREUSSMANN, R.; SHANI, J.; *Cancer Lett.* **1990**, 50, 157.
- Wikipedia, 2010. <http://pt.wikipedia.org/wiki/Cosmético>, acessada em setembro 2010.
- WITEK, M. A. SWAIN, G. M. *Anal. Chim. Acta*, **2001**;440, 119.
- XU, J.; SWAIN, G. M. *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 1502.
- XUEMIN, L.; WANG, J.; CHEN, D.; LIU, F.; ZHANG, Z.; *Ziran Kexueban*, **2006**, 46(5), 641.
- YOUNG, J. C.; *J. Chromatogr.* **1978**, 151, 215.
- YU, H., WANG, H.; QUAN, X.; CHEN, S.; ZHANG, Y.; *Electrochemistry Communications*, **2007**, 9, 2280.
- YU, H.; QUAN, X.; CHEN, S.; ZHAO, H.; *Environ. Sci. Technol.* **2009**, 43, 1935.